



# Verbesserte *in vitro* und *in planta* DNA-Reparatur durch CPD-Photolyasen.

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Gebhard Alexander Kaiser**  
**geboren in Krefeld**

Marburg an der Lahn 2012

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
angenommen am: 24.02.2012

Erstgutachter: Prof. Dr. Alfred Batschauer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Lars Oliver Essen

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2012

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Resultate wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

**Kaiser G., Kleiner O., Beisswenger C. und Batschauer A.** (2009) "Increased DNA repair in Arabidopsis plants overexpressing CPD photolyase." *Planta* **230**: 505-15.

**Klar T., Kaiser G., Hennecke U., Carell T., Batschauer A. und Essen L. O.** (2006) "Natural and non-natural antenna chromophores in the DNA photolyase from *Thermus thermophilus*." *Chembiochem* **7**(11): 1798-806.

Weitere Publikationen:

**Okafuji A., Biskup T., Hitomi K., Getzoff E. D., Kaiser G., Batschauer A., Bacher A., Hidema J., Teranishi M., Yamamoto K., Schleicher E. und Weber S.** (2010) "Light-induced activation of class II cyclobutane pyrimidine dimer photolyases." *DNA Repair (Amst)* **9**(5): 495-505.

**Hendrischk A. K., Fruhwirth S. W., Moldt J., Pokorny R., Metz S., Kaiser G., Jager A., Batschauer A. und Klug G.** (2009) "A cryptochrome-like protein is involved in the regulation of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides*." *Mol Microbiol* **74**(4): 990-1003.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Schädigung der DNA durch UV-Strahlung.....	1
1.1.1	Indirekte Schäden.....	1
1.1.1.1	Entstehung von Reaktiven Sauerstoffspezies durch UV-Strahlen .....	1
1.1.1.2	Schäden durch Reaktive Sauerstoffspezies .....	2
1.1.2	Direkte Schäden .....	3
1.1.2.1	Pyrimidindimere.....	3
1.2	Lichtunabhängige DNA-Reparatursysteme .....	6
1.2.1	Basenexzisionsreparatur .....	6
1.2.2	Nukleotidexzisionsreparatur .....	7
1.2.3	Nicht Homologes End Joining und Homologe Rekombination .....	8
1.2.4	Translänionssynthese .....	8
1.3	Lichtabhängige DNA-Reparatursysteme – Die Photolyase Cryptochrom Familie .....	8
1.3.1	Die Familienmitglieder und ihre Biologische Funktion .....	8
1.3.2	Der FAD-Kofaktor .....	10
1.3.2.1	Photoaktivierung.....	12
1.3.2.2	Photoreaktivierung .....	13
1.3.2.3	Weitere Elektronentransportprozesse .....	15
1.3.3	Die Antennenpigmente .....	15
1.4	UV-Resistenz und DNA-Reparatur bei Blütenpflanzen .....	17
1.4.1	Anpassungen an und Abschirmen von UV-Stress .....	17
1.4.2	Anpassungen der DNA-Reparatur an UV-Stress .....	18
1.4.2.1	Lichtunabhängige DNA-Reparatursysteme .....	18
1.4.2.2	Lichtabhängige DNA-Reparatursysteme .....	19
1.4.2.3	DNA Reparatur in Organellen .....	19
1.4.2.4	Regulation der Anpassungen .....	20
1.4.2.5	DNA Reparatur und UV-Resistenz bei Pflanzen .....	21
1.5	Zielsetzung.....	22
2	Material und Methoden.....	23

2.1	Material .....	23
2.1.1	Geräte.....	23
2.1.1.1	Photobiologisches Gerät .....	25
2.1.1.2	ÄKTA Purifier .....	25
2.1.1.3	Mikroskope .....	26
2.1.1.4	Software .....	26
2.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmittel.....	27
2.1.3	Plasmide, Gene und Oligos.....	27
2.1.4	Organismen .....	30
2.1.4.1	<i>Escherichia coli</i> .....	30
2.1.4.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	30
2.2	Kulturhaltung.....	31
2.2.1	<i>Escherichia coli</i> .....	31
2.2.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	31
2.2.2.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> Zellkultur .....	32
2.3	Molekularbiologische Methoden .....	32
2.3.1	Grundtechniken.....	32
2.3.1.1	Präparation von Plasmiden .....	32
2.3.1.2	Alkoholische Fällung von Nukleinsäuren .....	34
2.3.1.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	34
2.3.1.4	Restriktionsverdau .....	34
2.3.1.5	Elektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren .....	34
2.3.1.6	Ligation.....	35
2.3.1.7	Kompetente Zellen und Transformation .....	36
2.3.1.8	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	37
2.3.2	Polymerase Kettenreaktion.....	38
2.3.2.1	PCR zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen .....	38
2.3.2.2	Quantitative RT-PCR.....	40
2.3.3	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> Protoplasten.....	43
2.3.4	Isolation von Gesamt-DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> Blättern .....	45
2.3.5	Southern Blot .....	46

2.3.5.1	Herstellung einer DIG-markierten DNA Sonde .....	46
2.3.5.2	DNA-Transfer auf Membranen .....	46
2.3.5.3	Hybridisierung und Detektion der Sonde .....	46
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	48
2.4.1	Grundtechniken.....	48
2.4.1.1	Proteinbestimmung .....	48
2.4.1.2	Proteinextraktion aus <i>A. thaliana</i> .....	49
2.4.1.3	Elektrophoretische Trennung von Proteinen .....	50
2.4.1.4	Western Blot Analyse.....	53
2.4.1.5	Ultrafiltration .....	55
2.4.2	Proteinreinigung.....	56
2.4.2.1	Zellaufbruch .....	56
2.4.2.2	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatografie .....	57
2.4.2.3	Ionenaustausch Chromatografie .....	57
2.4.2.4	Gelfiltration .....	58
2.4.2.5	Antigen spezifische Affinitätschromatografie .....	59
2.4.3	Analyse von proteingebundenen Flavin-Cofaktoren .....	61
2.4.3.1	Identifikation und Quantifizierung von Flavinen .....	61
2.4.3.2	Analyse der Photoreduktion .....	62
2.4.4	Messung der Enzymaktivität von Photolyasen .....	62
2.4.4.1	Herstellen CPD-haltiger DNA als Substrat und Standard.....	62
2.4.4.2	<i>In vitro</i> Enzymtest unter anaeroben Bedingungen.....	62
2.4.4.3	Messung der CPD-Photolyase Reparaturaktivität <i>in planta</i> .....	64
2.4.4.4	Analyse des relativen CPD-Gehaltes von DNA durch ELISA.....	64
2.4.5	Proteinkristallisation .....	66
2.5	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie.....	66
3	Ergebnisse .....	68
3.1	Ergebnisse der <i>in vitro</i> Untersuchungen.....	68
3.1.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> Photolyase .....	68
3.1.1.1	Reinigung der At-PHR1.....	68
3.1.1.2	Kristallisation der At-PHR1.....	69

3.1.2	<i>Thermus thermophilus</i> Photolyase.....	70
3.1.2.1	Bindung der Cofaktoren.....	70
3.1.2.2	Die Rolle der FMN-Antenne bei Photoreduktion und Photoreaktivierung	71
3.2	Ergebnisse der <i>in planta</i> Untersuchungen an CPD-Photolyase überexprimierenden Linien .....	74
3.2.1	Transformation.....	74
3.2.2	Analyse der At-PHR1-Expression.....	75
3.2.2.1	Analyse der At-PHR1-Expression auf transkriptioneller Ebene .....	75
3.2.2.2	Analyse der At-PHR1-Expression auf posttranskriptioneller Ebene .....	76
3.2.3	Zelluläre Lokalisation von At-PHR1 .....	77
3.2.4	Effekte der At-PHR1-Überexpression auf die CPD-Akkumulation und das Wachstum der Pflanzen unter UV-Belastung .....	78
3.2.4.1	Akkumulation von CPDs unter UV-Bestrahlung.....	78
3.2.4.2	Einfluss von UV-Bestrahlung auf das Wachstum .....	79
4	Diskussion.....	82
4.1	Diskussion der <i>in vitro</i> Experimente.....	82
4.1.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> Photolyase.....	82
4.1.1.1	Reinigung der At-PHR1.....	82
4.1.1.2	Kristallisation der At-PHR1.....	82
4.1.2	<i>Thermus thermophilus</i> Photolyase.....	82
4.2	Diskussion der <i>in planta</i> Experimente mit <i>Arabidopsis thaliana</i> Photolyase .....	84
4.2.1	Transformation und Expression des 2x35S::At-PHR1 Konstrukts.....	84
4.2.2	Zelluläre Lokalisation von At-PHR1 .....	84
4.2.3	Einfluss der Photolyase Überexpression auf die Akkumulation von CPDs und das Wachstum unter UV-Belastung .....	86
5	Zusammenfassung.....	89
6	Dank.....	90
7	Lebenslauf .....	91
8	Verzeichnisse.....	93
	Abkürzungsverzeichnis.....	93
	Abbildungsverzeichnis.....	96
	Tabellenverzeichnis .....	97

Literaturverzeichnis.....	98
---------------------------	----



# 1 Einleitung

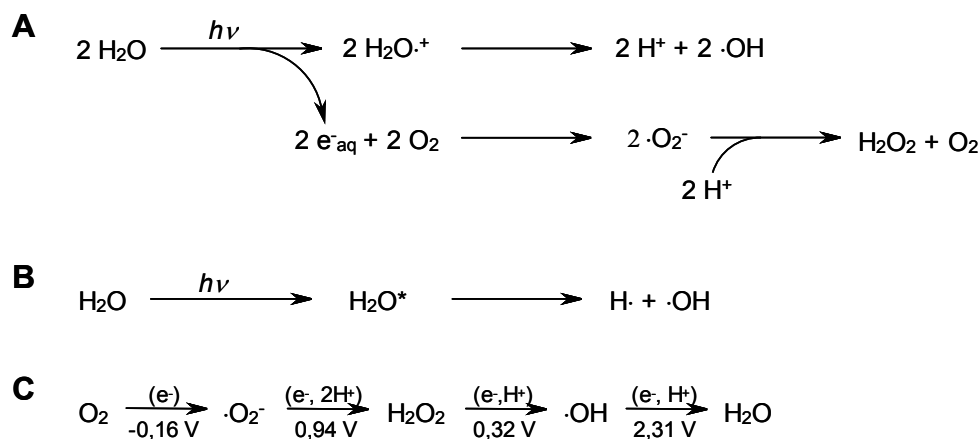
## 1.1 Schädigung der DNA durch UV-Strahlung

UV-abhängig entstandene DNA Schäden können in zwei Gruppen unterteilt werden, direkte und indirekte Schäden. Direkte Schäden entstehen durch Reaktionen, die durch die Absorption von Photonen durch die DNA ausgelöst werden. Indirekte Schäden hingegen resultieren aus chemischen Reaktionen der DNA mit Edukten, die in Abhängigkeit von UV-Strahlen entstanden sind (Friedberg *et al.*, 2006).

### 1.1.1 Indirekte Schäden

#### 1.1.1.1 Entstehung von Reaktiven Sauerstoffspezies durch UV-Strahlen

Indirekte UV-Schäden entstehen vor allem durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Durch das große Vorkommen von Wasser in biologischen Systemen ist die Radiolyse von Wasser die bedeutendste Quelle von Reaktiven Sauerstoffspezies, die für die UV-abhängige Schädigung der DNA verantwortlich sind. Die Radiolyse kann durch die Ionisierung eines Wassermoleküls erfolgen und resultiert dann in einem hydratisierten Elektron ( $e^-_{aq}$ ) und  $H_2O^+$ . Alternativ zerfällt photochemisch angeregtes Wasser ( $H_2O^*$ ), zu  $H\cdot$  und einem Hydroxyl Radikal ( $\cdot OH$ ). Als Sekundärprodukte der Ionisierung des Wassers entstehen aus dem rapiden Zerfall des  $H_2O^+$  ein  $H^+$  und ein  $\cdot OH$ . Zudem kann das hydratisierte Elektron mit Sauerstoff zu einem Superoxidradikal ( $\cdot O_2^-$ ) reagieren. Diese wiederum können mit Protonen zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid reagieren (Abbildung 1.1).

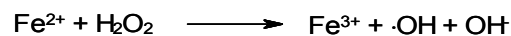


**Abbildung 1.1 Entstehung von ROS durch die Radiolyse von Wasser**

**A** Primär- und Sekundärreaktionen der Ionisierung von Wasser. **B** Radiolyse durch Anregung von Wasser zu  $H\cdot$  und  $\cdot OH$ . **C** Die verschiedenen ROS und die zugehörigen Redoxpotenziale: Molekularer Sauerstoff ( $O_2$ ), das Superoxid Radikal ( $\cdot O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), das hochreaktive Hydroxylradikal ( $\cdot OH$ ) und Wasser ( $H_2O$ ) (verändert nach: (Breen & Murphy, 1995) und (Friedberg *et al.*, 2006))

### 1.1.1.2 Schäden durch Reaktive Sauerstoffspezies

ROS sind hoch reaktiv und können nicht nur DNA sondern nahezu alle biologisch wichtigen Moleküle schädigen. Lipidoxidation und Oxidation von freien oder in Polypeptiden gebundenen Aminosäuren sind häufig anzutreffende Folgen von ROS (Stadtman, 1993; Niki, 2009), die Zellen großen Schaden zufügen können. Für Nukleinsäuren geht von den ROS  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , und  $\cdot\text{OH}$  eine unterschiedliche Gefährdung aus. Das hochreaktive  $\cdot\text{OH}$  ist bei Weitem gefährlicher als das deutlich stabilere  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder das  $\cdot\text{O}_2^-$ . Das Superoxidradikal kann jedoch zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagieren (Abbildung 1.1 A) und dieses kann durch die Fenton-Reaktion mit  $\text{Fe}^{2+}$  schließlich wieder zu dem gefährlichen Hydroxylradikal umgesetzt werden (Abbildung 1.2) (Fenton, 1894; Henle & Linn, 1997).

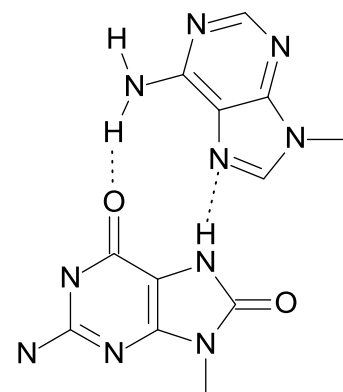


**Abbildung 1.2 Fenton-Reaktion**

Entsteht eines der hochreaktiven elektrophilen Hydroxylradikale in direkter Umgebung der DNA, kann es diese auf zwei Arten schädigen. Erstens durch Addition an die Doppelbindungen der Basen und zweitens durch Abstraktion von Wasserstoffatomen von den Zuckern des Rückgrats (Breen & Murphy, 1995).

Etwa 20 % der Angriffe von Hydroxylradikalen richten sich gegen die Zucker des Rückgrats. Dies kann entweder zu Strangbrüchen (Rhaese & Freese, 1968; Cadet *et al.*, 2005) oder zur Spaltung der glycosidischen Bindung zwischen Rückgrat und Base und somit zu abasischen Positionen führen (Povirk & Steighner, 1989). Da durch ionisierende Strahlen häufig Cluster von Hydroxylradikalen entstehen, können Strangbrüche der beiden komplementären DNA Stränge räumlich so nahe beieinander liegen, dass es zu Doppelstrangbrüchen kommt. Dies ist charakteristisch für Schädigung durch ionisierende Strahlung, da Doppelstrangbrüche durch ROS aus anderen Quellen sehr selten sind. Hierdurch kann man zwischen strahlungsabhängig und strahlungsunabhängig entstandenen Schäden unterscheiden (Ward, 1985).

Die aus der Oxidation der Basen resultierenden Produkte sind sehr vielzählig. Alleine für Cytosin können nach  $\gamma$ -Bestrahlung in wässriger Lösung über 40 Oxidationsprodukte nachgewiesen worden (Polverelli & Teoule, 1974a, b). Bjelland und Seeberg (2003) beschreiben in ihrem Review 80 bekannte Schäden an DNA Basen durch Oxidation. Da die oxidativen Schäden an Basen derart vielfältig sind, soll hier exemplarisch nur das 8-oxo-7,8-Dihydroguanin (8-oxoG) als eines der Hauptprodukte der UV-abhängigen Oxidation von DNA Basen vorgestellt werden (Kasai & Nishimura, 1984). Es entsteht durch die Saturierung des Imidazolrings. Da 8-oxoG in *syn* Konfiguration eine Basenpaarung mit Adenin eingehen kann, ist es ein starkes Prämutagen und führt während der Replikation zu einer Transversion von C nach A (Abbildung 1.3) (Shibutani *et al.*, 1991). Durch sein häufiges Auftreten kann das 8-oxoG als biologischer Marker für den Umfang der oxidativen Schäden der DNA *in vivo* genutzt werden (Shigenaga *et al.*, 1989).



**Abbildung 1.3 8-Oxoguanin**  
8-Oxoguanin (unten) in  
Basenpaarung mit Adenin (oben)

### 1.1.2 Direkte Schäden

Direkte Schäden an der DNA entstehen durch photochemische Aktivierung der DNA. Die beiden Hauptprodukte sind das Cyclobutan Pyrimidin Dimer (CPD) und das 6-4 Photoprodukt ((6-4)PP). Zudem gibt es einige weniger bedeutende Nebenprodukte. Bakterielle Sporen stabilisieren ihre DNA durch Assoziation mit kleinen säurelöslichen Proteinen. Diese halten die DNA in einer wasserfreien A-Konformation. Unter diesen speziellen Bedingungen kann es nach Photoaktivierung des  $\pi$ -Elektronensystems eines Thymins zwischen C5 und C6 zu einer Addition der Methylgruppe an die C5 Position eines benachbarten Thymins kommen, was zur Bildung des Sporen Photoprodukts führt (Varghese, 1970). Anregung an gleicher Stelle kann auch, unabhängig von der DNA-Konformation, zu der Addition von Wasser und in dessen Folge zu Bildung von Pyrimidinhydraten führen (Abbildung 1.4) (Yamane *et al.*, 1967). Dies gilt besonders für Cytosin. Das resultierende Cytosinhydrat ist instabil und zerfällt schnell wieder zu Cytosin oder desaminiert zu Uracil (Boorstein *et al.*, 1990). Das gleiche gilt für das 5-Methylcytosin Hydrat, es desaminiert jedoch zu Thymin (Vairapandi & Duker, 1994). Die Desaminierung von Cytosin führt dann zu einer Transition von Guanin zu Adenin. Durch die direkte photochemische Aktivierung der DNA kann es zudem zur Bildung von Querverbindungen innerhalb eines oder zwischen zwei DNA-Strängen kommen (Marmur & Grossman, 1961). Querverbindungen zwischen DNA und Proteinen sind ebenfalls möglich (Fornace & Kohn, 1976). Zudem können Basen und Zucker der DNA photochemisch ionisiert werden. Die resultierenden radikalischen Carbokationen sind elektrophil und reagieren vor allem mit Hydroxylionen. Die Produkte dieser Reaktionen entsprechen denen der radikalischen Oxidation der DNA durch ROS (Görner, 1994).

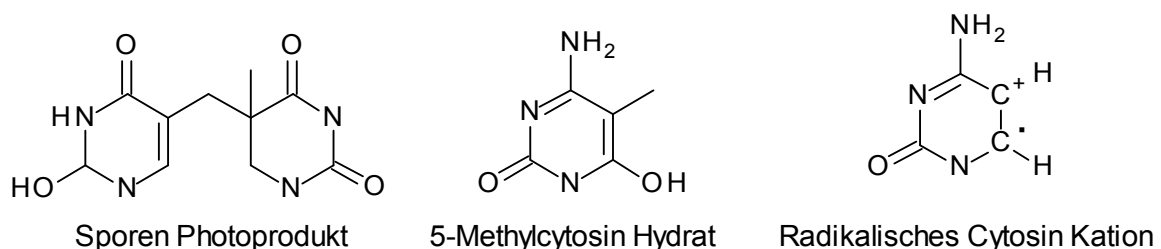


Abbildung 1.4 Direkte DNA-Schäden

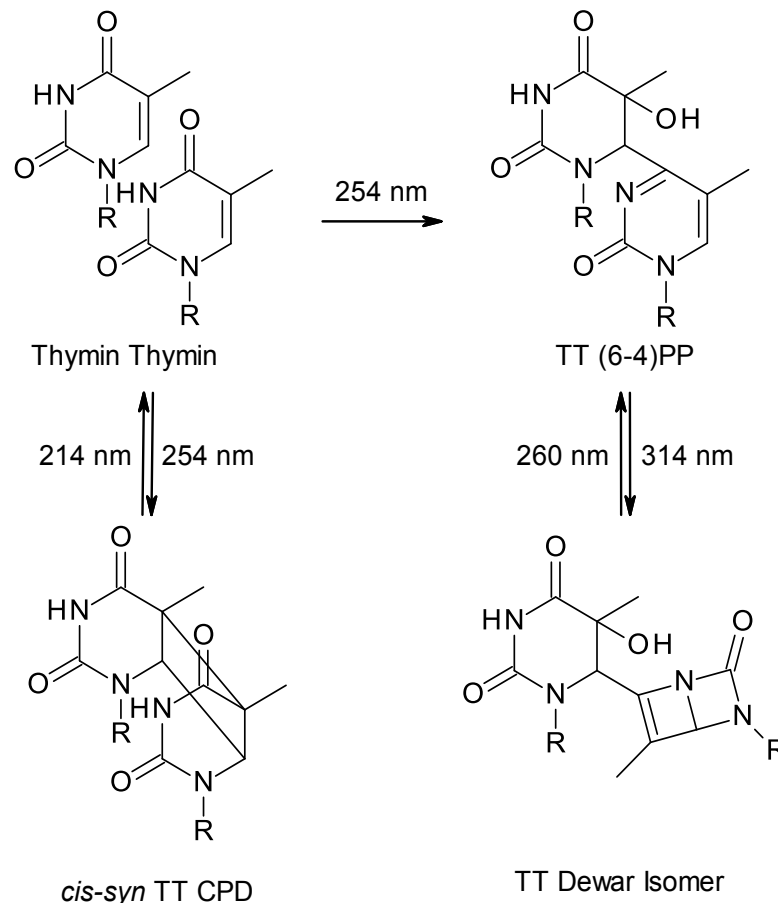
#### 1.1.2.1 Pyrimidindimere

Pyrimidindimere entstehen nach UV-Anregung des  $\pi$ -Elektronensystems zwischen C5 und C6 des Pyrimidins. Durch die hierdurch entstehende kovalente Bindung zwischen zwei benachbarten Pyrimidinen wird dieses saturiert. Hierbei kann es zu einer Cycloaddition, die dann beide Pyrimidine mit einem Cyclobutanring verbindet und das Cyclobutanpyrimidindimer (CPD) darstellt, kommen. Auch die Bildung einer Bindung zwischen der C6 Position des 5' Pyrimidins und C4 des 3' Pyrimidins, dem (6-4) Photoprodukt ((6-4)PP), ist möglich. Das (6-4) PP kann zudem zu dem Dewar Isomer umgesetzt werden (Abbildung 1.5). Die Bildung von CPDs wird deutlich bevorzugt, sodass (6-4)PP nur 20-30 % der Pyrimidindimere ausmachen (Thoma, 1999).

##### 1.1.2.1.1 (6-4)Photoprodukt und Dewar Isomer

Kommt es zu einer kovalenten Bindung zwischen der C6 Position des 5' Pyrimidins und C4 des 3' Pyrimidins spricht man vom (6-4)PP (Varghese & Wang, 1967; Wang & Varghese, 1967; Varghese & Wang, 1968; Franklin *et al.*, 1985). Es kann an jeder möglichen Position zwischen

zwei benachbarten Pyrimidinen entstehen. Die Position TC wird jedoch bevorzugt, gefolgt von CC, TT und CT (Bourre *et al.*, 1987). An der Position CC schützt Methylierung an Position C5 des 3' Cytosins vor der Bildung des (6-4)PP (Brash & Haseltine, 1982; Glickman *et al.*, 1986). Durch Photoanregung des (6-4)PP kann dieses photoreversibel in das Dewar-Isomer umgesetzt werden (Patrick, 1970; Nishio *et al.*, 1978).



#### Abbildung 1.5 Pyrimidindimere

Thymin Thymin; TT (6-4)PP, Thymin Thymin (6-4) Photoprodukt; TT Dewar Isomer, das aus dem TT (6-4)PP resultierende Dewar Isomer; *cis-syn* TT CPD, *cis-syn* Thymin Thymin Cyclobutanpyrimidindimer

Sowohl das (6-4)PP als auch das Dewar-Isomer sind prämutagen, unterscheiden sich jedoch in ihren Eigenschaften. Wird ein (6-4)PP in *E. coli* repliziert, kommt es zu 91 % zu einer Mutation bei der es sich zu 93 % um eine T zu C Transition am 3'Ende des (6-4)PP handelt. Ein Dewar Isomer führt nur in 53 % aller Replikationen zu einer Mutation und auch nur zu 46 % zu der T zu C Transition des (6-4)PP. Sequenzen mit beiden Schäden werden in *E. coli* unter physiologischen Bedingungen nur zu 1,9 % beziehungsweise 0,4 % im Vergleich zu einer schadenfreien Sequenz repliziert. Wird das SOS-System induziert, steigen die Replikationsfrequenzen auf 22,1 % und 12,3 % (LeClerc *et al.*, 1991). Die Eigenschaften beider Schäden lassen sich durch ihre dreidimensionalen Strukturen erklären. Bei beiden Schäden stehen die beiden kovalent verbundenen Ringsysteme nahezu perpendicular zueinander. Zudem führt die kovalente Bindung zu einer Verkürzung des Abstandes der Phosphatgruppen des Rückgrats von 7,11 Å auf 6,13 Å beim (6-4)PP beziehungsweise auf 6,51 Å beim Dewar Isomer (Lee *et al.*, 2000). Durch die Fehlstellung der geschädigten Basen

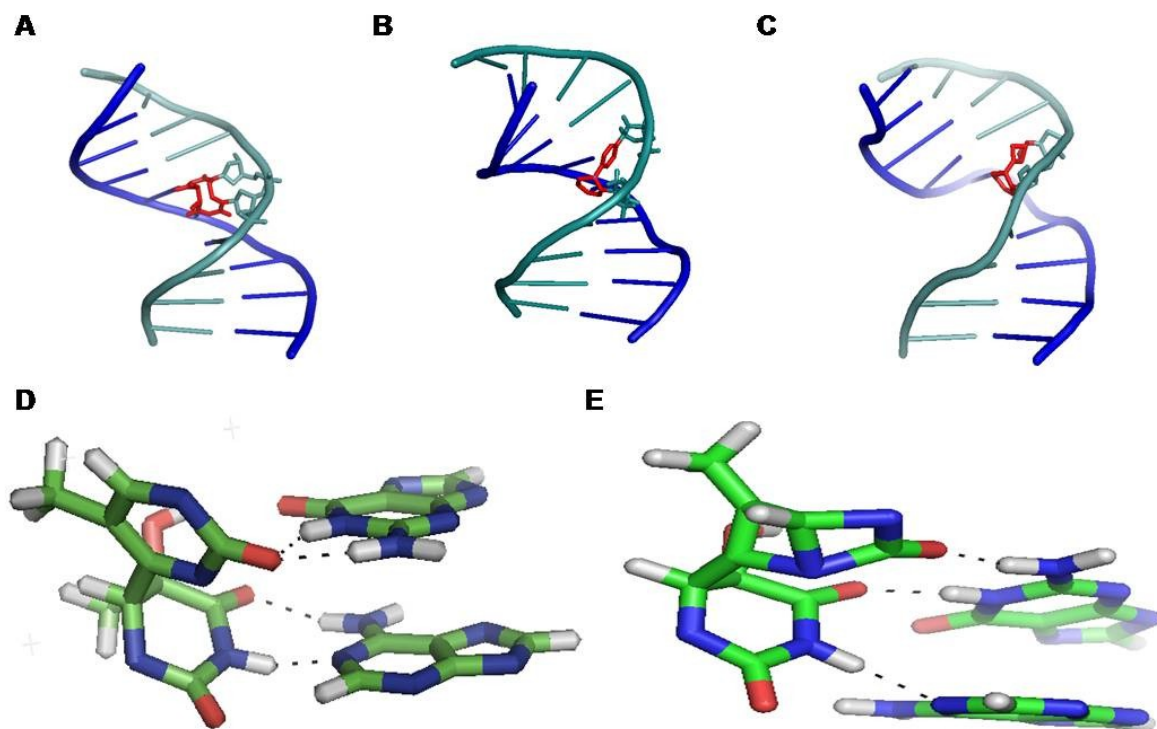
wird zudem eine normale Watson-Crick Basenpaarung mit den komplementären Basen unterbunden. Beides führt zu einer starken Verzerrung der helikalen Struktur der DNA. Ein TT (6-4)PP verursacht so eine Krümmung der DNA von  $44^\circ$  und ein Entwinden der Doppelhelix von  $32^\circ$  (Kim & Choi, 1995). Ersetzt nun am 3'Ende des Schadens das auch bei der Mutagenese bevorzugte Guanin das komplementäre Adenin, kann dieses mit seiner Imino- und Aminofunktion Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Sauerstoff der Carbonylgruppe an Position 2 des 3'Thymins des Schadens eingehen. Hierdurch reduziert sich die Krümmung der Doppelhelix auf  $27^\circ$  und ihre Entwindung auf  $2^\circ$ , was diese mutagene Basenpaarung stabilisiert (Abbildung 1.6) (Lee *et al.*, 1999). Beim Dewar Isomer wird die DNA-Doppelhelix um  $21^\circ$  gekrümmt und um  $16^\circ$  entwunden. Im Gegensatz zum (6-4)PP verringert ein komplementäres Guanin am 3'Ende des Schadens die Verzerrung des Rückgrates nicht. Zwar kann das Dewar-Isomer eine Wasserstoffbrücke zum Adenin und zwei zum Guanin bilden, doch wird nur eine von der Carbonylgruppe an Position 4 des 5'Thymins zur Iminogruppe des Guanins gebildet. Dies führt zur Vergrößerung der Helixkrümmung auf  $43^\circ$  und zu einer Entwindung von  $39^\circ$  (Abbildung 1.6). Dies erklärt, warum die T zu C Transition beim Dewar Isomer nicht derart bevorzugt gebildet wird wie beim (6-4)PP. Die sperrige rechtwinklige Anordnung der Basen in beiden Schäden führt zur Blockade von DNA- und RNA-Polymerasen (LeClerc *et al.*, 1991; Mone *et al.*, 2001).

#### 1.1.2.1.2 Cyclobutanpyrimidindimer

Bei der Entstehung von CPDs kommt es durch eine [2+2] Cycloaddition zur Ausbildung eines Cyclobutanrings zwischen den C5 und C6 Positionen der benachbarten Pyrimidine (Beukers & Berends, 1960). In Lösung können alle vier möglichen Konfigurationen, *trans-syn*, *trans-anti*, *cis-anti* und *cis-syn* entstehen. Die Vororientierung der Basen innerhalb der B-DNA Doppelhelix führt jedoch dazu, dass es hier nur zu *cis-syn* Dimeren kommt. In ssDNA kann das CPD zudem in *trans-syn* Konformation entstehen. Im Kontext mit der DNA-Sequenz entsteht das CPD am häufigsten zwischen zwei benachbarten Thyminen, das genaue Verhältnis beträgt 68 : 13 : 16 : 3 für T<>T : C<>T : T<>C : C<>C (Mitchell *et al.*, 1992). Da die Cycloaddition photoreversibel ist (Setlow, 1966), erreicht die CPD-Bildung eine Sättigung, die für jedes der möglichen Dimere von der Qualität und Quantität der Bestrahlung abhängig ist (Setlow, 1968).

Im Vergleich zu dem (6-4)PP und dem Dewar Isomer ist das CPD ein schwächeres Prämutagen. Wird es repliziert, kommt es nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 7 % zu einer Mutation. Diese liegt zu 88 % am 3'Ende des Schadens. Es kommt hierbei zu T zu A Transversionen und T zu C Transitionen, wobei die Transversion leicht bevorzugt gebildet wird. T zu G Transversionen kommen hingegen nicht vor. Die Replikation selbst wird durch das CPD jedoch fast vollständig unterbunden. Die Replikationsrate von CPD-haltigen Plasmiden liegt unter physiologischen Bedingungen nur bei 0,4 % und bei etwa 30 % bei induziertem SOS-System in *E. coli* (Banerjee *et al.*, 1988). Der Grund für die geringe Mutagenität des CPDs findet sich in seiner räumlichen Struktur. Da die für die Watson Crick Basenpaarung nötigen Imin-, Keto- und Carboxylfunktionen der Basen durch die Cycloaddition nicht verändert werden und die räumliche Dislokation der Basen moderat ist, können beide Basen des CPDs weiterhin die normale Watson Crick Basenpaarung aufrecht erhalten. Hierdurch entwindet sich die Doppelhelix nur um  $9^\circ$ . Durch den Cyclobutanring wird der Abstand der C5 und C6 Atome der beiden Pyrimidine jedoch auf 1,5 Å verkürzt und die beiden sonst parallel stehenden Basen neigen sich mit einem Winkel von  $50^\circ$  zueinander. Dies führt zu einem Knick der Doppelhelix von  $22^\circ$  zur Major Groove hin (Abbildung 1.6) (Park *et al.*, 2002). CPDs blockieren zudem die Transkription, wenn sie auf dem

Templatestrang lokalisiert sind (Donahue *et al.*, 1994). Sie sind für 70 % der UV-abhängigen *in vivo* Inhibition der RNA-Polymerase Aktivität in *E. coli* verantwortlich (Hackett & Sauerbier, 1974). Zudem verändern CPDs die Bindeeigenschaften von Proteinen, die mit DNA assoziieren. Dies gilt besonders für Transkriptionsfaktoren. Deren Affinität zu ihren Bindestellen wird durch CPDs bis zu einem Faktor von 60 gesenkt (Tommasi *et al.*, 1996). Die Affinität des Transkriptionsfaktors TFIID/TBP zu seiner Bindestelle wird hingegen durch Thymindimere erhöht (Vichi *et al.*, 1997).



**Abbildung 1.6 Räumliche Strukturen der Pyrimidindimere**

**A** Doppelsträngiges DNA Decamer mit Thymin Thymin CPD; **B** Doppelsträngiges DNA Decamer mit Thymin Thymin (6-4)PP in Basenpaarung mit Guanin am 3' Ende des Schadens; **C** Doppelsträngiges DNA Decamer mit Thymin Thymin Dewar Isomer in Basenpaarung mit Guanin am 3' Ende des Schadens; **D** Ausschnitt aus B, die die mutagene Basenpaarung des (6-4)PP mit Guanin an der 3' Position des Schadens zeigt; **E** Ausschnitt aus C, die die mutagene Basenpaarung des Dewar Isomers mit Guanin an der 3' Position des Schadens zeigt. Die einzelnen Abbildungen wurden mit PyMOL Version 0.99rc6 ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)) aus den Protein Data Bank Files 1N4E (CPD), 1CFL ((6-4)PP) und 1QKG (Dewar Isomer) erstellt.

## 1.2 Lichtunabhängige DNA-Reparatursysteme

### 1.2.1 Basenexzisionsreparatur

Die Basenexzisionsreparatur (BER) ist das in der Natur meistgenutzte DNA Reparatursystem. Der Reparaturprozess wird durch DNA Glykosylasen genannte Enzyme initiiert (Lindahl, 1976). Diese binden geschädigte Basen spezifisch, katalysieren die Hydrolyse der glykosidischen Bindung zwischen Base und Desoxyribose und erzeugen somit eine abasische Position. Derart initiierte Exzisionsreparatur nennt man BER, da hier die modifizierte Base ausgeschnitten wird (Duncan *et al.*, 1976). Um den geschädigten DNA Strang wiederherzustellen, muss nun die abasische Position repariert werden. Dies erfolgt durch eine weitere enzymatische Prozessierung der schadhaften Position. An der abasischen Position wird nun durch eine AP-Endonuklease der Phosphodiester am 5' Ende hydrolysiert,

oder durch eine AP-Lyase der DNA Strang am 3'Ende durchtrennt. Das so entstehende terminale Desoxyribose Phosphat wird durch eine weitere Endonuklease oder eine DNA Desoxyribose Phosphodiesterase entfernt. Die so entstehende Lücke im DNA-Strang wird nun durch DNA Polymerase und Ligase Aktivität wieder aufgefüllt und der DNA Strang somit schadenfrei wiederhergestellt (Friedberg *et al.*, 2006).

Von besonderer Bedeutung für die UV-Resistenz sind die nur bei einigen Prokaryoten, Phagen und Viren vorkommenden Pyrimidindimer Glykosylasen. Sie erkennen spezifisch CPDs und katalysieren in einem ersten Schritt die Spaltung der glykosidischen Bindung zwischen Desoxyribose und CPD an der 5'Position des CPDs. In einem zweiten Schritt hydrolysieren sie den 3'Phosphodiester der so entstandenen abasischen Position. Anschließend wird das Nukleotid, welches nun das CPD trägt, entfernt und der DNA Strang durch DNA Polymerase und Ligase repariert (Haseltine *et al.*, 1980; Radany & Friedberg, 1980; Warner *et al.*, 1980; Lloyd, 2005).

### 1.2.2 Nukleotidexzisionsreparatur

Im Gegensatz zur BER, die die geschädigten Basen vom Rückgrat der DNA trennt und sie als freie Basen aus der DNA entfernt, schneidet die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) das Rückgrat flankierend zu dem DNA-Schaden und setzt diesen, in einem Oligonukleotid gebunden, frei. Auch wenn es verschiedene NER Systeme gibt, folgen alle den folgenden vier Schritten: (i) die Erkennung des Schadens, (ii) Entwinden der Doppelhelix in der Umgebung des Schadens, (iii) Exzision 5' und 3' flankierend zum Schaden und (iv) Resynthese der ausgeschnittenen Nukleotide mit anschließender Ligation. Bei Eukaryonten kann man zwischen Globaler Genom Reparatur (GGR) und Transkriptions-gekoppelter Reparatur (TCR) unterscheiden. Bei der GGR erkennt entweder das XPE- oder das XPC-Protein den DNA-Schaden durch direkte Interaktion mit der DNA. Alternativ kann dies auch durch das *DNA-Damage Binding Protein* (DDB) erfolgen. Bei der TCR wird durch die Proteine CSA oder CSB der stabile Elongationskomplex, den die RNA Polymerase II beim Transkriptionsarrest an einem nicht überschreibbaren DNA-Schaden bildet, erkannt. Beide DNA-Protein-Komplexe werden dann vom Transkriptionsfaktor II H Komplex (TFIIH) erkannt. Dieser beinhaltet unter anderem die DNA-Helikasen XPB und XPD, welche die DNA flankierend zum Schaden entwinden. Nun kann durch die Endonukleasen XPF und XPG flankierend zum TFIIH-Komplex der geschädigte DNA Strang durchtrennt werden, wodurch das vom TFIIH gebundene, den DNA-Schaden enthaltende Oligonukleotid freigesetzt wird. Die so entstandene einzelsträngige Lücke in der Doppelhelix wird nun durch PCNA und RFC erkannt und durch DNA Polymerase  $\delta$  aufgefüllt. Abschließend wird der neu synthetisierte Strang durch DNA Ligase I mit dem bestehenden Strang verbunden (Kimura & Sakaguchi, 2006).

Die Proteine XPE und XPC erkennen die DNA Schäden bei der Initiation der GGR nicht spezifisch. Sie binden vor allem DNA Positionen, an denen die Helixstruktur der DNA entwunden ist. Da das *cis syn* CPD die DNA aber nur um moderate 9° entwindet, werden diese durch die NER nicht effektiv erkannt und repariert. Die Reparatureffizienz des humanen NER-Systems ist für (6-4)PP mehr als 10-mal größer als für CPDs (Szymkowski *et al.*, 1993). Dies entspricht den Affinitäten von XPE zu den einzelnen Pyrimidindimeren (Reardon *et al.*, 1993). Die DNA Schäden erkennenden Faktoren des NER-Systems sind zudem für die schadensabhängige Arretierung des Zellzyklus essenziell (Sancar *et al.*, 2004).

### 1.2.3 Nicht Homologes End Joining und Homologe Rekombination

Doppelstrangbrüche sind schwere DNA Schäden; ein einzelner kann zum Tod einer Zelle führen. Sie können durch Nicht Homologes End Joining (NHEJ) oder Homologe Rekombination (HR) repariert werden.

Beim NHEJ werden die beiden durch den Doppelstrangbruch entstandenen Enden wieder miteinander ligiert und eventuelle Lücken im Doppelstrang durch DNA Polymerase geschlossen. Da die Ligation bei mehreren Strangbrüchen nicht zwischen den einzelnen Enden unterscheiden kann, kann es hier zu Insertionen oder Deletionen kommen (Pastwa & Blasiak, 2003).

Frei von solchen Fehlern ist die HR. Sie nutzt eine intakte Kopie der zu reparierenden DNA-Region, zum Beispiel von Schwesterchromatiden oder homologen Chromosomen, als Template. Vom Doppelstrangbruch aus wird in Leserichtung der DNA-Polymerase die DNA einzelsträngig verdaut. Die so generierten Enden können nun mit der homologen DNA-Region hybridisieren und so als Primer für die DNA-Neusynthese dienen. Die Dissoziation dieses Synthesekomplexes ist bei Eukaryonten weitgehend unklar. In der Folge werden die entstandenen überhängenden Basen entfernt und die neu synthetisierten Basen durch Ligase mit den vorhandenen Basen verbunden (Kimura & Sakaguchi, 2006).

### 1.2.4 Translasionssynthese

Translasiations-Polymerasen nehmen eine Sonderrolle bei der DNA-Reparatur ein. Streng genommen sind sie kein DNA-Reparatursystem, da sie den geschädigten DNA Strang unrepariert lassen. Sie sind jedoch in der Lage, eine Vielzahl von DNA Schäden korrekt zu replizieren und leisten somit einen bedeutenden Beitrag zur Schadenstoleranz (Waters *et al.*, 2009).

## 1.3 Lichtabhängige DNA-Reparatursysteme – Die Photolyase Cryptochrom Familie

### 1.3.1 Die Familienmitglieder und ihre Biologische Funktion

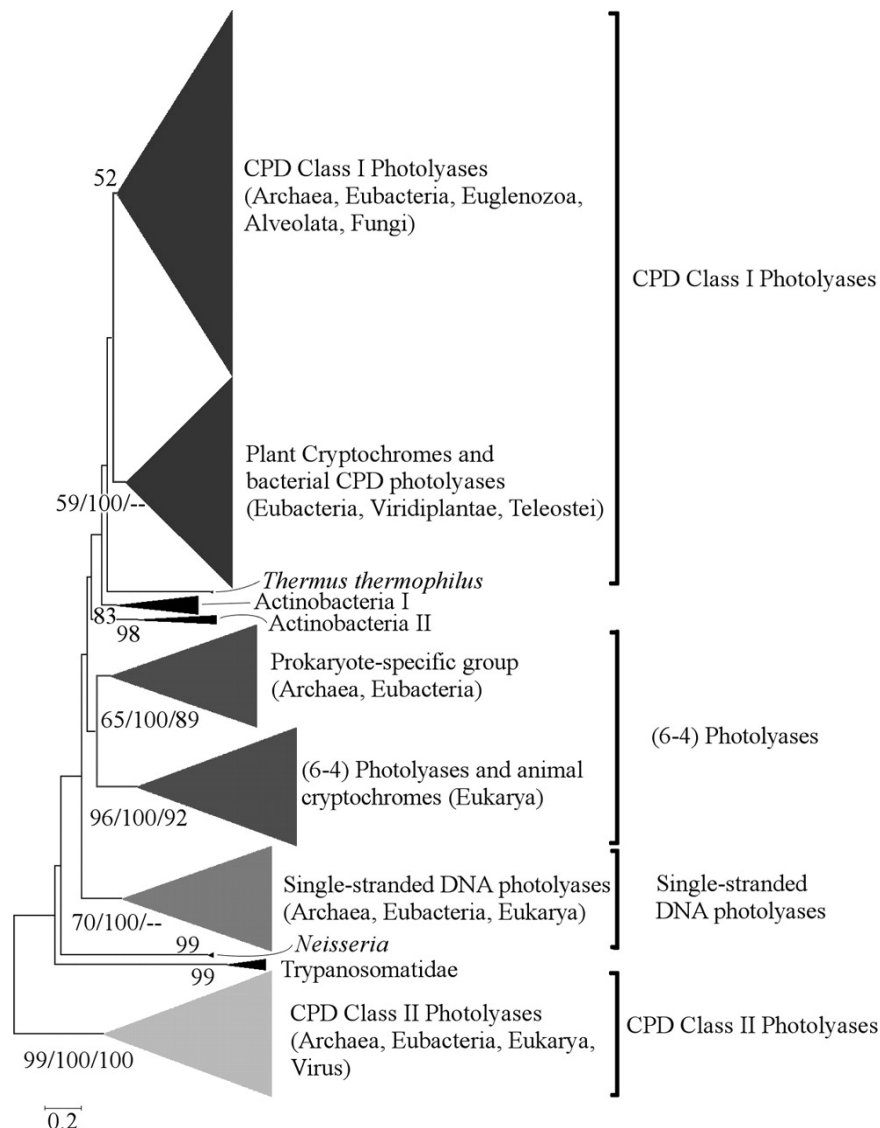
Funktionell lassen sich die Mitglieder der Photolyase Cryptochrom Familie in Cryptochrome und Photolyasen unterteilen. Cryptochrome sind Photorezeptoren und nutzen die von ihnen absorbierte Lichtenergie zum Wechsel zwischen ihrem signalinaktiven und signalaktiven Zustand. Photolyasen hingegen sind lichtgetriebene Enzyme, die die absorbierte Lichtenergie für die Katalyse der DNA-Reparatur nutzen. Weiterhin sind sie in (6-4) Photolyasen, die spezifisch das (6-4)PP reparieren oder in CPD Photolyasen, die spezifisch CPDs reparieren, unterteilt.

Allen Familienmitgliedern ist die Photolyase ähnliche Domäne gemein. Sie besteht aus einer  $\alpha/\beta$ - und einer helikalen Subdomäne. Die  $\alpha/\beta$ - Domäne reicht bei *E. coli* Photolyase von Position 1-131 und enthält die  $\beta$ -Faltblatt Strukturen 1-5 und die  $\alpha$ -Helices 1-5. Die helikale Subdomäne erstreckt sich von Position 204-469 und enthält die Helices 7-20. Der beide Subdomänen verbindende Linker enthält die Helix 6 und erstreckt sich von Position 132 bis Position 203. Die helikale Subdomäne unterteilt sich in zwei Cluster. Der erste Cluster besteht aus den Helices  $\alpha 7$ - $\alpha 11$ , der zweite aus den Helices  $\alpha 12$ - $\alpha 20$ . Zwischen beiden Clustern wird der FAD-Kofaktor gebunden (Park *et al.*, 1995). Er wird bei allen Familienmitgliedern gefunden und seine lichtabhängigen Redoxreaktionen sind die



Grundlage der Photorezeptor- und der Enzymfunktion von Cryptochromen bzw. Photolyasen. Für viele Photolyasen oder Cryptochrome konnte zudem ein weiterer Kofaktor mit Antennenfunktion nachgewiesen werden, der die Quantenausbeute verbessert und das Aktionsspektrum erweitert. Cryptochrome besitzen häufig eine N- oder C-terminale Extension, die der Signalweiterleitung dient (Sancar, 2003).

Phylogenetisch ist die Familie diverser, als eine einfache Einteilung in ihre funktionellen Gruppen erwarten lässt (Abbildung 1.7). Entstanden ist sie vermutlich aus einer CPD-Photolyase (Kanai *et al.*, 1997), die als eines der ältesten DNA Reparatursysteme gilt (Eisen & Hanawalt, 1999). Bereits sehr früh in der Evolution der Familie haben sich die CPD-Photolyasen in die Klasse I und die Klasse II CPD Photolyasen geteilt. Die Klasse II erfährt im Laufe der Evolution keine weiteren Veränderungen und kann bis heute vor allem bei höheren mehrzelligen Organismen wie Tieren und Pflanzen gefunden werden. Sie können zudem bei einigen Vertretern einzelliger Algen, Archaeobakterien und Eubakterien nachgewiesen werden. Die Klasse I CPD Photolyasen, die vor allem bei Mikroorganismen gefunden wurden, sind der Ursprung aller weiteren Gruppen der Familie. Aus ihnen gingen zunächst die DASH Cryptochrome hervor. Sie sind nach den Organismen benannt in denen sie zuerst entdeckt wurden *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis* und *Homo sapiens*, bzw. zu denen sie verwandtschaftliche Nähe haben. Ihre biologische Funktion ist bis heute weitgehend unklar. *In vitro* zeigen sie jedoch Photolyaseaktivität, wenn sich das zu reparierende CPD in einzelsträngiger DNA oder in Loop-Strukturen von Duplex DNA befindet (Selby & Sancar, 2006). Strukturelle und funktionelle Untersuchungen haben gezeigt, dass DASH Cryptochrome nicht in der Lage sind, das CPD aus der Doppelhelix zu winden, um es in ausreichenden Kontakt mit dem katalytisch aktiven FADH<sup>•</sup> zu bringen (Huang *et al.*, 2006; Pokorny *et al.*, 2008). Aus diesem Grund werden sie auch als einzelstrangspezifische Photolyasen bezeichnet (Selby & Sancar, 2006). Bisherige Untersuchungen an DASH Cryptochrom Mutanten oder DASH Cryptochrom überexprimierenden Linien haben gezeigt, dass DASH Cryptochrome keinen signifikanten Beitrag zu der UV-Resistenz der untersuchten Organismen leisten (Brudler *et al.*, 2003; Kleine *et al.*, 2003; Reisbacher, 2009). Dies macht eine relevante *in vivo* Photolyasefunktion von DASH Cryptochromen sehr unwahrscheinlich. Da die Benennung von Enzymen nach ihrer biologischen Funktion bewährte Praxis in der Biologie ist, verwende ich hier nicht den Terminus „einzelstrangspezifische Photolyasen“ sondern werde bei der Bezeichnung DASH Cryptochrom bleiben, auch wenn sie noch von provisorischer Natur ist. Die nächste Gruppe, die sich von den Klasse I CPD Photolyasen abgespalten hat, sind die (6-4)Photolyasen. Sie teilen sich in eine Prokaryoten- und eine Eukaryoten-spezifische Gruppe. Bei den Tieren entwickelte sich aus den (6-4)Photolyasen die für sie spezifische Cryptochromgruppe der tierischen Cryptochrome. Sie sind an der Steuerung des circadianen Rhythmus beteiligt (Öztürk *et al.*, 2007). Als letzte Gruppe trennen sich die pflanzlichen Cryptochrome von den Klasse I Photolyasen. Sie haben mannigfaltige Funktion bei der Steuerung der Entwicklung und der Regulation der inneren Uhr über den gesamten Lebenszyklus der Pflanze hinweg (Yu *et al.*, 2010). Öztürk *et al.* (2007) beschreiben in ihrem Stammbaum eine weitere Gruppe, die Klasse III CPD-Photolyasen, deren Relevanz jedoch kontrovers diskutiert wird (Lucas-Lledó & Lynch, 2009). Kürzlich wurde von Oberpichler *et al.* (2011) eine weitere Gruppe zwischen den Klasse I CPD-Photolyasen und den pflanzlichen Cryptochromen beschrieben. Das in ihrer Arbeit beschriebene PHR B bindet zusätzlich zu dem FAD ein Eisen-Schwefel-Cluster. Nach diesem wurde die Gruppe Fe-S *bacterial cryptochromes and photolyases* (FeS-BCPs) benannt. Dies ist das erste Protein in der Familie, welches ein Eisen-Schwefel-Cluster bindet. Mitglieder dieser Familie finden sich vor allem bei den  $\alpha$ -Proteobakterien.



**Abbildung 1.7 Stammbaum der Photolyase Cryptochrom Familie**

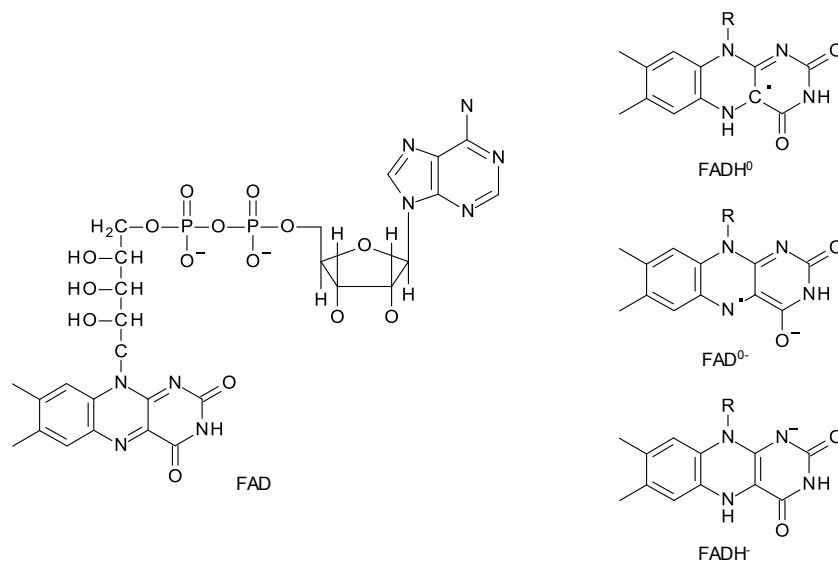
Unrooted Neighbor-joining Baum der Photolyase Cryptochrom Familie aus (Lucas-Lledó & Lynch, 2009). Die Beschriftung der Äste gibt zuerst den Bootstrapwert in Prozent an, dann den Bootstrap des entsprechenden Astes eines Maximum Parsimony Consensus Baums und drittens die Wahrscheinlichkeit eines entsprechenden Astes nach Bayesiananalyse.

### 1.3.2 Der FAD-Kofaktor

Der FAD-Kofaktor ist das zentrale Element aller Mitglieder der Photolyase Cryptochrom Familie. Er kann bei allen Mitgliedern der Familie gefunden werden und seine lichtabhängigen Redoxreaktionen sind die Grundlage ihrer Funktion. Gebunden wird er von der helikalen Subdomäne der Photolyase-ähnlichen Domäne in einer ungewöhnlichen U-förmigen Konformation. Hierdurch gelangen der Isoalloxazin- und der Adeninring in räumliche Nähe zueinander. Durch die Bindung zwischen den beiden Clustern der helikalen Subdomäne liegt das Flavin tief in der helikalen Subdomäne, hält beide Cluster zusammen und erfüllt somit auch strukturelle Aufgaben. Dies erklärt auch, warum Photolyase Apoproteine ihr Substrat nicht mehr binden können, da das Enzym ohne das FAD seine für die Substratbindung nötige Faltung nicht aufrecht halten kann.

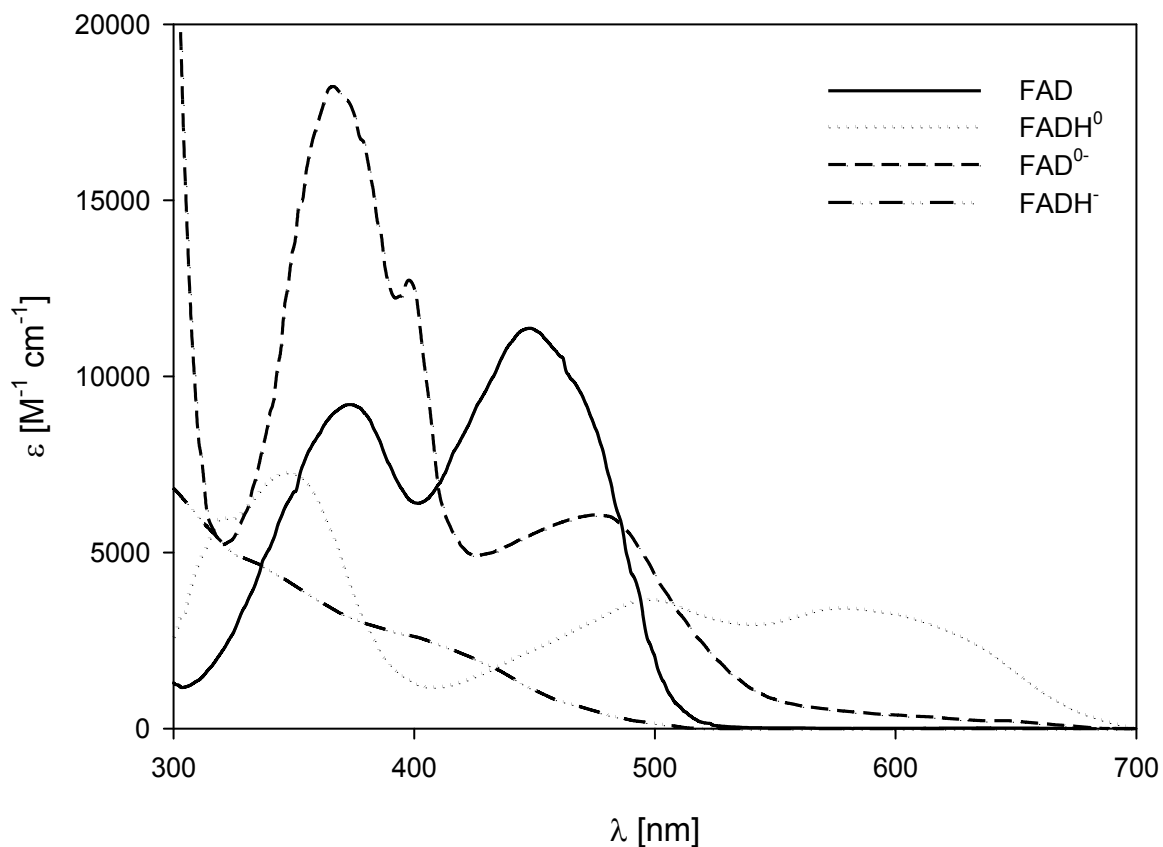
FAD wurde in vier verschiedenen Redoxzuständen in Photolyasen oder Cryptochromen gefunden: als oxidiertes FAD, um ein Elektron reduziertes Semichinon Radikal  $\text{FADH}^0$ , um ein

Elektron reduziertes  $\text{FADH}^{0-}$  Radikal Anion und um zwei Elektronen reduziertes  $\text{FADH}^-$  (Abbildung 1.8). Da die unterschiedlichen Redoxzustände durch das  $\pi$ -Elektronensystem des Isoalloxazinrings stabilisiert werden, können sie absorptionsspektrometrisch charakterisiert werden (Abbildung 1.9). Auch wenn es mehrere lichtabhängige Elektronentransportvorgänge in Photolyasen und Cryptochromen gibt, sind die Photoaktivierung und bei den Photolyasen die Photoreaktivierung die für die Funktion essenziellen Prozesse. Bei der Photoaktivierung wird die Lichtenergie genutzt, um den Redoxzustand des FADs zu ändern. Für die Cryptochrome ist dies der zentrale Prozess ihrer Funktionalität, da sie so lichtabhängig zwischen ihren signalinaktiven und signalaktiven Formen wechseln können. Im Gegensatz hierzu ist für Photolyasen die lichtabhängige Übertragung von Elektronen auf das zu reparierende Pyrimidindimer, die Photoreaktivierung, der zentrale Prozess ihrer Funktion. Die Photoaktivierung gewährleistet jedoch, dass das FAD in dem hierfür notwendigen zweielektronenreduzierten Zustand vorliegt.



**Abbildung 1.8 Die verschiedenen Redoxzustände von FAD**

FAD, oxidiertes FAD;  $\text{FADH}^0$ , neutrales Semichinon Radikal;  $\text{FAD}^{0-}$ , anionisches Semichinon Radikal;  $\text{FADH}^-$ , zweielektronenreduziertes FAD.



**Abbildung 1.9 Absorption der verschiedenen Flavin Species in Abhängigkeit der Wellenlänge**

Durchgezogene Linie, Oxidiertes FAD aus (Islam *et al.*, 2003); gepunktete Linie, um ein Elektron reduziertes radikalische Semichinon Form  $\text{FADH}^0$  aus (Palfey & Massey, 1998); gestrichelte Linie, um ein Elektron reduziertes radikalische anionische Form  $\text{FAD}^{0-}$  aus (Palfey & Massey, 1998); gestrichelt gepunktete Linie, um zwei Elektronen reduziertes  $\text{FADH}^-$  aus (Müller, 1991).

### 1.3.2.1 Photoaktivierung

Bei der Photoaktivierung wird der FAD-Kofaktor durch einen lichtabhängigen Elektronentransport innerhalb des Proteins reversibel reduziert. Photolyasen können so das FAD in den katalytisch aktiven, reduzierten Zustand überführen. Pflanzliche Cryptochrome wechseln hierbei zwischen ihrem signalinaktiven oxidierten oder zwei Elektronen reduzierten in den signalaktiven, semireduzierten Redoxzustand und zurück. Hierfür entzieht das angeregte Flavin einem benachbarten Tryptophan (W382 in *E. coli*) das für die Reduktion nötige Elektron. Dieses Tryptophan ist der Anfang einer Tryptophantriade, die bei *E. coli* Photolyase über Tryptophan 359 und Tryptophan 306 an die Oberfläche des Proteins führt. Von hier aus wird das Tryptophan 382 durch die so gebildete Elektronentransportkette rereduziert. Tryptophan 306, die terminale Aminosäure der Transportkette, entzieht die hierfür nötigen Elektronen dem Medium (Park *et al.*, 1995). Bei einigen Photolyasen wie z.B. aus *Anacystis nidulans* ist zudem Tyrosin am Elektronentransport beteiligt (Aubert *et al.*, 1999). Auch wenn die Tryptophantriade in *E. coli* keine essenzielle Funktion bei der DNA-Reparatur erfüllt (Kavakli & Sancar, 2004), ist sie doch bei allen Mitgliedern der Photolyase Cryptochrom Familie mit Ausnahme der Klasse II CPD Photolyasen (Kanai *et al.*, 1997) und den FeS-BCPs (Oberpichler *et al.*, 2011) streng konserviert. Bei pflanzlichen Cryptochromen ist eine funktionelle Tryptophantriade für die Photorezeptorfunktion essenziell (Zeugner *et*

*al.*, 2005). Bei tierischen Cryptochromen ist dies jedoch nicht der Fall, hier entspricht der semireduzierte Zustand des FAD dem Grundzustand und die Tryptophantriade ist nicht essenziell für die Photorezeptorfunktion (Öztürk *et al.*, 2008). In Klasse II CPD Photolyasen konnte durch molekulare Modellierung eine mögliche alternative Tryptophantriade identifiziert werden (Okafuji *et al.*, 2010). Inzwischen konnte diese auch experimentell durch die Kristallstruktur einer Klasse II Photolyase von *Methanosarcina mazei* bestätigt werden (Kiontke *et al.*, 2011). Zu dem Elektronen Transportweg der FeS-BCPs gibt es bis heute keine experimentellen Studien. Es ist jedoch gezeigt worden, dass der FAD Cofaktor von PHR B aus *Agrobacterium tumefaciens* photoreduzierbar ist (Oberpichler *et al.*, 2011). Eine weitere Funktion dieses biradikalischen Mechanismus könnte die Cryptochrom- und lichtabhängige Magnetorezeption von Zugvögeln sein (Biskup *et al.*, 2009; Rodgers & Hore, 2009).

### 1.3.2.2 Photoreaktivierung

Als Photoreaktivierung bezeichnet man die lichtabhängige DNA-Reparatur durch Photolyasen. Durch UV-Bestrahlung inaktivierte Kulturen von Mikroorganismen konnten so in Abhängigkeit von sichtbarem Licht reaktiviert werden (Dulbecco, 1949; Kelner, 1949). Nachfolgend wurde gezeigt, dass dieser Schritt durch ein Enzym katalysiert wird, welches man als Photolyase bezeichnete (Rupert *et al.*, 1958; Rupert, 1960). Die Reparatur von DNA Schäden ist dabei ein Prozess, der in drei Schritten abläuft. Zuerst wird der DNA-Schaden lichtunabhängig von der Photolyase erkannt und gebunden. Dann wird er lichtabhängig durch einen Elektronentransport von  $\text{FADH}^-$  zum Schaden hin repariert. Der katalytische Zyklus wird danach durch den Rücktransport des Elektrons zum Flavin geschlossen und das Produkt aus der Bindetasche entlassen.

#### 1.3.2.2.1 CPDs

##### 1.3.2.2.1.1 Substratbindung

Die Bindung des Substrates an CPD Photolyasen erfolgt lichtunabhängig an die helikale Domäne des Holoenzym (Payne *et al.*, 1990). Sie ist sequenzunabhängig jedoch strukturspezifisch für CPDs (Svoboda *et al.*, 1993). Die Affinität gegenüber CPDs ist  $10^5$  fach höher als gegenüber B-DNA ohne Schaden (Kim & Sancar, 1991). Wie für strukturabhängige DNA-Bindungen üblich, dient vor allem das Rückgrat der DNA als Kontaktpunkt für die DNA-Protein-Interaktion. An diesem Kontakt sind drei Phosphate am 3'Ende des geschädigten Stranges, eines am 5'Ende, die Zucker und Phosphate komplementär zum CPD und 4 Basenpaare in 3' Richtung dieses Stranges beteiligt (Mees *et al.*, 2004). Hierfür ist die Photolyase mit einer positiv geladenen Oberfläche entlang der Substratbindestelle ausgestattet (Park *et al.*, 1995). Durch die Bindung an das Enzym wird der durch das CPD entstehende Knick in der Doppelhelix von  $22^\circ$  (Park *et al.*, 2002) auf etwa  $50^\circ$  vergrößert. Zudem wird das CPD aus der Doppelhelix gewunden und so in räumliche Nähe zum FAD gebracht. Dort befindet sich ein Glutamat. Protoniert stabilisiert es das während der Katalyse entstehende anionische radikalische Zwischenprodukt der Reaktion (Mees *et al.*, 2004). Bei der Photolyase aus Hefe resultiert der Austausch dieser Aminosäure zu Alanin in einer Reduktion der Enzymaktivität von 60% ohne die Substratbindung zu beeinflussen (Vande Berg & Sancar, 1998).

##### 1.3.2.2.1.2 Katalyse der Cycloreversion

Theoretisch sind zwei Mechanismen für die Spaltung des Cyclobutylrings denkbar. Zum einen die direkte Übertragung der Anregungsenergie von den Chromophoren der Photolyase

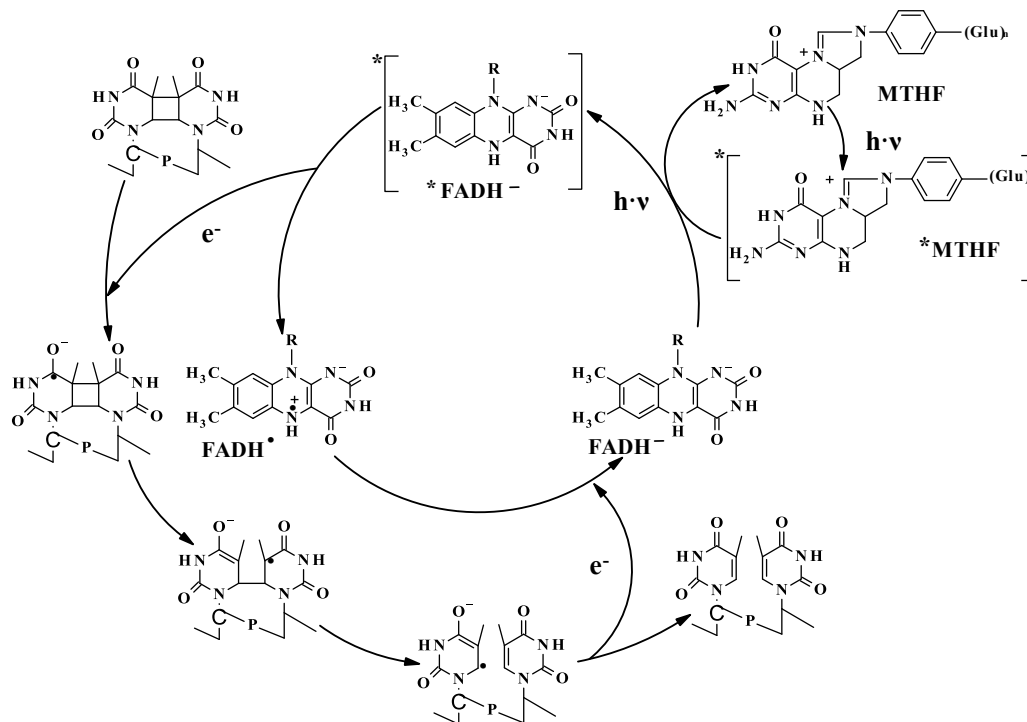
auf das CPD. Zum anderen eine lichtabhängige Elektronenübertragung zwischen dem CPD und den proteingebundenen Cofaktoren. Die Energie des von der Photolyase für die Reparatur des CPDs genutzten Lichts im UV-A und blauen Bereich ist nicht ausreichend, um eine direkte Cycloreversion auszulösen. Zudem absorbiert das CPD nur Licht mit deutlich kürzerer Wellenlänge, was eine direkte Energieübertragung ausschließt. Folgerichtig kann es sich bei der Photolyase-katalysierten Reparatur nicht um eine direkte lichtinduzierte Cycloreversion handeln (Sancar, 2003). In diversen Modellsystemen konnte jedoch gezeigt werden, dass lichtabhängige Injektion oder Abstraktion von Elektronen aus oder in den Cyclobutylring des CPDs zur Cycloreversion führen (Begley, 1994). Fraglich war, ob bei der Photoreaktivierung der Cyclobutylring reduziert oder oxidiert wird und welche Rolle die beiden Cofaktoren während der Reparatur spielen. 1987 gelang es (Payne *et al.*, 1987; Sancar *et al.*, 1987) durch Wirkungsspektroskopie,  $\text{FADH}^-$  *in vivo* und *in vitro* als einzig aktive Flavinspezies zu identifizieren. Da  $\text{FADH}^-$  die vollständig reduzierte Form des FADs ist, kann es sich nur in Form einer Reduktion des Cyclobutylrings am Reaktionsmechanismus beteiligen. Dass  $\text{FADH}^-$  lichtinduziert Elektronen auf den Cyclobutylring eines CPDs übertragen kann und diesen damit spaltet, konnte im Modellversuch in wässriger Lösung gezeigt werden (Hartman & Rose, 1992). Okamura *et al.* (1991) konnten durch Picosekunden Laser-Flash Spektroskopie die Bildung eines Zwischenproduktes mit einer Absorption von  $\approx 400$  nm während der Reaktion nachweisen. In zeitaufgelösten EPR Spektren von Photolyase-Substrat-Gemischen, die nach Lichtpulsen aufgenommen wurden, konnte zudem nachgewiesen werden, dass dieses Zwischenprodukt radikalisch ist (Kim *et al.*, 1992b). Beides stützt die Elektronentransport-Hypothese, die heute als akzeptiert gilt. Das bei der Reduktion des CPDs entstehende radikalische CPD-Anion wird durch das deprotonierte Glutamat (Glu 283 in *Anacystis nidulans* Photolyase) der Bindetasche stabilisiert (Mees *et al.*, 2004).

Über den Weg der Elektronen zum CPD ist nur wenig bekannt. Möglich ist sowohl eine direkte Elektronenübertragung vom Isoalloxazin-Ring des Flavins auf das CPD als auch ein Transport über den Adeninring des  $\text{FADH}^-$  (Mees *et al.*, 2004).

#### 1.3.2.2.2 (6-4)PP

Bei der Bildung von (6-4)PP geht die Ketogruppe an C4 des 3' Pyrimidins verloren und es bildet sich am C5 des 5' Pyrimidins eine zusätzliche Hydroxygruppe. Würde nun einfach die kovalente Bindung zwischen beiden Basen wie bei der Reparatur des CPDs gespalten, würde die Reparatur zwei weiterhin modifizierte Basen hinterlassen. Die Reparatur des (6-4)PP gestaltet sich deshalb katalytisch aufwendiger, da die beiden Basen nicht nur voneinander getrennt, sondern auch modifiziert werden müssen.

Trotzdem ist der Reparaturprozess von (6-4) Photolyasen dem von CPD Photolyasen sehr ähnlich. Zuerst wird das Substrat lichtunabhängig am Reaktionszentrum gebunden und das (6-4)PP aus der Helix gewunden, um es in räumliche Nähe des katalytisch aktiven  $\text{FADH}^-$  zu bringen. Die Hydroxygruppe an C5 wird nun durch eine Wasserstoffbrücke von dem in (6-4) Photolyasen konservierten Histidin (His 365 in *Drosophila melanogaster* (6-4) Photolyase) gebunden. Nach der lichtabhängigen Reduktion durch das  $\text{FADH}^-$  wird die Hydroxygruppe durch His 365 protoniert und geht als Wasser ab. Dieses kann nun das Acylimin angreifen und einen radikalischen Übergangszustand bilden. Dieser zerfällt dann durch den Elektronenrücktransport zum  $\text{FADH}^0$  und durch Reprotonierung des His 365 zu den reparierten Basen (Maul *et al.*, 2008).



**Abbildung 1.10 Reaktionsmechanismus von CPD Photolyasen**

MTHF (Methenyl-Tetrahydrofolat) absorbiert ein Photon und überträgt die Anregungsenergie auf das  $FADH^-$ . Dieses injiziert ein Elektron in das CPD, welches daraufhin ein Thymin und ein Thymin<sup>0</sup> bildet. Der Elektronenrücktransport zum  $FADH^0$  stellt das katalytisch aktive  $FADH^-$  wieder her und schließt so den katalytischen Zyklus. Modifiziert nach (Sancar, 2003).

### 1.3.2.3 Weitere Elektronentransportprozesse

In Klasse I CPD Photolyasen und DASH Cryptochromen kann das  $FADH^-$  neben der Spaltung des CPD zudem lichtabhängig den Pterin Cofaktor reduzieren. Die biologische Funktion dieses Prozesses ist nicht bekannt (Moldt *et al.*, 2009). In *E. coli* Photolyase kann auch das Tryptophan 277 nach Lichtanregung den Cyclobutylring des CPDs reduzieren und somit das CPD spalten. Da Tryptophan nur Licht mit einer Wellenlänge von  $< 300$  nm absorbiert und dieses im solaren Spektrum auf der Erdoberfläche kaum enthalten ist, geht man davon aus, dass dieser Reparaturweg keinen Beitrag zur UV-Resistenz von Lebewesen leistet (Kim *et al.*, 1992a).

### 1.3.3 Die Antennenpigmente

Von fast allen Mitgliedern der Photolyase Cryptochrom Familie ist bekannt, dass sie zusätzlich zum FAD einen weiteren Cofaktor binden. Bei diesem handelt es sich meist um 5,10-Methenyltetrahydrofolat (MTHF) oder 8-Hydroxy-5-Deazaflavin (8-HDF). Die Photolyase aus *E. coli* bindet MTHF, die aus *A. nidulans* 8-HDF. Da in den beiden Studien von 1987 zum Reaktionsmechanismus der Photolyase (Payne *et al.*, 1987; Sancar *et al.*, 1987) nur das *E. coli* Enzym zur Verfügung stand, welches beide Cofaktoren gebunden hatte, blieb die Interpretation der Rolle der beiden Chromophoren zunächst unbefriedigend. 1990 konnte wiederum durch vergleichende aktionsspektroskopische Untersuchungen von *E. coli* Photolyase mit und ohne Pterincofaktor gezeigt werden, dass das Pterin nicht am Elektronentransport in den Cyclobutylring beteiligt ist, sondern als Antennencofaktor absorbierte Lichtenergie auf das katalytisch aktive Flavin überträgt (Payne & Sancar, 1990). Diese Energieübertragung erfolgt über Förstertransfer. Gleiches gilt für das von der *A.*

*nidulans* Photolyase gebundene 8-HDF (Malhotra *et al.*, 1992). Interessant ist, dass beide Antennenpigmente ihre eigenen Bindetaschen haben. MTHF wird in *E. coli* Photolyase in einer Kluft zwischen der helikalen- und der  $\alpha/\beta$ -Subdomäne gebunden. Es ist hierbei nicht vollständig vom Protein umschlossen, sondern hat direkten Kontakt zum Lösungsmittel. Dies ist auch der Grund für die geringe Bindungsstärke des Cofaktors zum Protein (Park *et al.*, 1995). 8-HDF wird von der Photolyase aus *A. nidulans* am Carbonylende des  $\beta$ -Faltblatts 2 der  $\alpha/\beta$ -Subdomäne ohne Kontakt zur helikalen Subdomäne gebunden. Das 8-HDF hat hierbei keinen Kontakt mit dem Lösungsmittel (Tamada *et al.*, 1997). Dies ist ein seltenes Beispiel für die Bindung von zwei verschiedenen Cofaktoren in verschiedenen Bindetaschen bei eng verwandten Proteinen mit homologen Strukturen (Weber, 2005). Über die Antennencofaktoren von Klasse II Photolyasen ist nichts bekannt, auch wenn MTHF als Cofaktor der Klasse II Photolyase von *Arabidopsis* publiziert ist (s. Kap. 1.4.2.2). Der native Antennen-Cofaktor der Photolyase aus *Thermus thermophilus* (Tt-PHR) ist nicht bekannt. Die dreidimensionale Struktur des Proteins zeigt jedoch deutlich, dass MTHF in der Spalte zwischen der helikalen- und der  $\alpha/\beta$ -Subdomäne nicht gebunden werden kann. Die Struktur der 8-HDF-Bindetasche ist der Antennen-Bindetasche von *A. nidulans* jedoch sehr ähnlich (Komori *et al.*, 2001). Da im *T. thermophilus* Genom die für die 8-HDF Synthese nötigen Gene nicht identifiziert werden konnten und keine 8-HDF abhängigen Enzyme in *T. thermophilus* beschrieben sind, ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei dem nativen Antennenpigment um 8-HDF handelt (Ueda *et al.*, 2005). Der native Antennen-Cofaktor ist also sehr wahrscheinlich ein 8-HDF ähnliches Molekül. In der gleichen Veröffentlichung zeigten die Autoren, dass Tt-PHR zusätzlich zum FAD den Cofaktor FMN bindet, wenn das Protein in *E. coli* exprimiert wird. Kernspinresonanzspektroskopie-Untersuchungen (NMR) haben zudem ergeben, dass das FMN in der 8-HDF-Bindetasche gebunden wird. Auch hat FMN einen positiven Effekt auf die Reparaturaktivität des Enzyms. Klar *et al.* (2006) konnten durch Kristallstrukturanalyse zeigen, dass die Bindung des FMN durch Tt-PHR mit der 8-HDF Bindung in *A. nidulans* Photolyase vergleichbar ist. Arginin 46 spielt bei der Bindung des FMNs wahrscheinlich eine Schlüsselrolle. Wird es durch Glutamat ersetzt, könnte dieses in einem antennenfreien Enzym resultieren (s. Kap. 3.1.2.1). Die Photolyase des Archaeobakteriums *Sulfolobus tokodaii* bindet FAD als Antennenpigment (Fujihashi *et al.*, 2007).

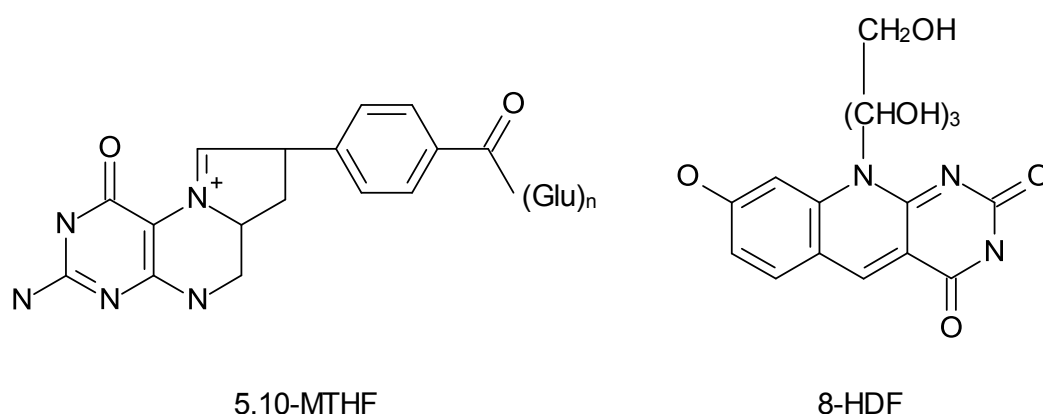


Abbildung 1.11 Antennenpigmente von Photolyasen



## 1.4 UV-Resistenz und DNA-Reparatur bei Blütenpflanzen

Pflanzen sind als photoautotrophe Lebewesen abhängig von Licht. Durch die im Sonnenlicht enthaltene UV-Strahlung müssen Pflanzen jedoch auch mit dem hiermit verbundenen Stress umgehen. Erschwert wird dies durch ihre sessile Lebensweise, da sie ungünstigen Umweltbedingungen, wenn diese überhand nehmen, nicht ausweichen können. Die Ausdünnung der Ozonschicht durch Fluorchlorkohlenwasserstoffe (FCKW) (Farman *et al.*, 1985) verstärkt die UV-Belastung, da hierdurch mehr UV-B die Erdoberfläche erreicht (Kerr & McElroy, 1993). Da die FCKWs langfristig in der Stratosphäre verbleiben (Molina & Rowland, 1974), ist es wahrscheinlich, dass dieser Zustand auch langfristig bestehen bleibt. Wild lebenden Pflanzen, die in ihren natürlichen Habitaten wachsen, scheint dieser zusätzliche UV-Stress nicht oder nur in geringem Masse zu schaden (Caldwell *et al.*, 2007), auch wenn es zu einer signifikanten Erhöhung an DNA-Schäden kommt (Rousseaux *et al.*, 1999). Sie haben, dem ständigen Selektionsdruck der solaren UV-Belastung ausgesetzt, hochkomplexe, vernetzte Signalwege realisiert, die es ihnen erlauben, sich optimal an die an ihrem Standort vorherrschenden Lichtbedingungen anzupassen (Körner, 2003). Für viele Nutzpflanzen hingegen ist bekannt, dass sie durch zusätzliche UV-Belastung deutliche Schäden erleiden, was zu einer Reduktion des Wachstums führen kann (Teramura, 1983; Stapleton *et al.*, 1997).

UV-Strahlung kann nahezu alle Bestandteile einer Zelle schädigen (s. Kap. 1.1). Entsprechend wichtig ist es für alle dem Sonnenlicht ausgesetzten Lebewesen, mit diesen Schäden umgehen zu können. Anpassungen an UV-Belastung erfolgen auf allen Ebenen des pflanzlichen Organismus. Hierbei verfolgen Pflanzen verschiedene Strategien. Zuerst versuchen Pflanzen Schäden zu vermeiden, indem sie essenzielle Bestandteile von der UV-Strahlung abschirmen, beziehungsweise die entstehenden ROS chemisch quenchen. Wird trotz allem ein essenzielles Molekül beschädigt, muss dieses ersetzt werden. So ist zum Beispiel die Kinetik der Chlorophyll Regeneration nach UV-Bestrahlung ein vielgenutzter Marker für die UV-Resistenz einer Pflanze. Da DNA durch ihre eigene Replikation vervielfältigt wird, kann sie nach Beschädigung nicht einfach ersetzt werden, da mit ihr die Matrize ihrer eigenen Reproduktion zerstört wurde. Die entstandenen DNA-Schäden zu reparieren ist die einzige Möglichkeit für einen Organismus, ein vollfunktionsfähiges Genom wiederzuerlangen.

### 1.4.1 Anpassungen an und Abschirmen von UV-Stress

Durch morphologische Anpassungen versuchen Pflanzen, Schädigungen durch UV zu vermeiden. Da die Wurzeln durch das Substrat und bei verholzten Pflanzen der Spross durch die tote Borke geschützt werden, ist dies bei den grünen Teilen der Pflanze und vor allem den Blättern zu beobachten. Hierbei ist es für Pflanzen von essenzieller Bedeutung, das UV aus dem Sonnenlicht zu filtern, ohne hierbei die photosynthetisch aktive Strahlung (PAR) daran zu hindern, das photosynthetisch aktive Gewebe zu erreichen. Hierfür können sie entweder versuchen, das Eindringen von UV durch Reflexion an der Blattoberfläche oder durch Absorption vom Gewebe zu verhindern.

Die Reflexion erfolgt an der Luft-Epidermis-Grenzfläche und verhindert damit, dass UV-Strahlung in das Gewebe eindringt. Sie ist jedoch nur bedingt wellenlängenspezifisch, sodass auch PAR teilweise reflektiert wird. Dies gilt vor allem für die Reflexion an Trichomen (Holmes & Keiller, 2002). Auf der Basis von Absorption erlauben Phenylpropanoide den Aufbau eines effektiven UV-Schutzschildes (Cockell & Knowland, 1999). Diese Stoffe, vor

allem Flavonoide, werden von Pflanzen verstärkt in der Epidermis gebildet und schützen so das tiefer liegende Mesophyll. Durch die hohe Absorption im UV-Bereich und die geringe Überlappung mit der Chlorophyll-Absorption, beeinflussen sie die PAR nur in geringem Maße (Tevini & Iwanzik, 1983). Gemeinsam können Reflexion und Absorption in der Epidermis bis zu 99% der UV-B-Strahlung aus dem Sonnenlicht entfernen und stellen so einen sehr effektiven Schutz für das Mesophyll dar (Robberecht *et al.*, 1980). Zudem sind viele Phenylpropanoide gute Radikalfänger und schützen somit auch gegen ROS (Kurkin, 2003). Wegen der geringen Eindringtiefe der UV-Strahlung in Gewebe führt eine Vergrößerung der Blattquerschnitte und die Reduktion der Apikaldominanz, die in einer stärkeren Beschattung der Blätter untereinander resultiert, zu einer effektiven Abschirmung (Jansen, 2002). Bei kurzzeitigem starken UV-Stress können Pflanzen auch durch Aufrollen der Blätter deren Oberfläche verkleinern (Jansen, 2002).

## 1.4.2 Anpassungen der DNA-Reparatur an UV-Stress

In Pflanzen sind verschiedene DNA Reparaturmechanismen realisiert. Viele von ihnen leisten einen unmittelbaren Beitrag zur Stress- und UV-Toleranz (Jiang *et al.*, 1997b; Hays, 2002; Balestrazzi *et al.*, 2011). Dies sind die lichtunabhängigen Basen- (BER) und Nukleotid Exzessionsreparatur (NER), Doppelstrang Bruch Reparatur durch homologes oder nicht homologes End Joining und die lichtabhängige Photoreaktivierung durch Photolyasen. Die Effektivität und die Spezifität aller dieser Reparaturwege sind entscheidend für die Stabilität des Pflanzengenoms und somit für die Gesundheit und Produktivität der Pflanze.

### 1.4.2.1 Lichtunabhängige DNA-Reparatursysteme

BER spielt bei der Antwort von Pflanzen auf DNA-Schäden eine Schlüsselrolle. Die Glykosylasen, die die BER initiieren, erkennen die Schäden an den Basen, die sie reparieren. Hierbei handelt es sich bei diesen Schäden um Oxidation durch ROS, Alkylierung, Desaminierung, Abasische Positionen oder Einzelstrangbrüche die sie spezifisch erkennen und vom Rückgrat trennen (s. Kap. 1.2.1) (Zharkov, 2008). Bei der UV-Resistenz von Pflanzen spielt BER eine große Rolle, da sie für die Reparatur der zahlreichen oxidativen Schäden an den Basen, die durch die Radiolyse von Wasser durch UV-Licht entstehen, verantwortlich ist. Bis heute konnte in Pflanzen jedoch keine CPD spezifische Glykosylase identifiziert werden.

NER ist ein DNA-Reparatursystem, welches Schäden, die zu großen Verzerrungen der Helixstruktur der DNA führen, repariert (s. Kap. 1.2.2). Pflanzen verfügen über ein GGR und ein TCR-System, sodass die NER entweder durch einen UV-DDB- oder einen XPC-Komplex direkt auf dem DNA-Schaden oder durch einen CSA- oder CSB-Komplex am stabilen Elongationskomplex der RNA-Polymerase II initiiert werden kann. Mutationen in den Faktoren *XPF*, *XPG* und *XPD* führen zu Hypersensitivität gegen UV- und  $\gamma$ -Strahlen (Jiang *et al.*, 1997b; Liu *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003). Eine Nullmutante für das *DDB1A* in *Arabidopsis* führt ebenfalls zu UV-Hypersensitivität, die Überexpression dieses Faktors zu UV-Hyposensitivität (Al Khateeb & Schroeder, 2009).

Pflanzen reparieren Doppelstrangbrüche sowohl durch homologe Rekombination als auch durch Nicht Homologes End Joining, wobei Letzteres das bei Weitem häufiger genutzte System ist. Dies ist wahrscheinlich der Grund dafür, warum in Blütenpflanzen ein gezielter Knock-out von Genen durch homologe Rekombination nicht effizient ist (Kimura & Sakaguchi, 2006).

Das der UV-sensitiven *Arabidopsis* Mutante *rev3-1* zugehörige Gen kodiert für eine Transläsions DNA Polymerase  $\zeta$ . Die Mutante zeigt zudem Sensitivität gegenüber  $\gamma$ -Strahlung und Mitomycin C, einem quervernetzenden Agens.

#### 1.4.2.2 Lichtabhängige DNA-Reparatursysteme

Pflanzen besitzen sowohl CPD als auch (6-4)PP spezifische Photolyasen. In *Arabidopsis* codieren die Gene *At-PHR1* und *At-UVR3* jeweils für eine CPD und eine (6-4)PP Photolyase (Ahmad *et al.*, 1997; Nakajima *et al.*, 1998). Nullmutationen in beiden Genen führen zu UV-Hypersensitivität, wobei die CPD-Photolyase Mutante *uvr2-1* etwa sieben mal sensitiver als die Wildtyppflanze gegenüber UV ist, die (6-4)PP Photolyase Mutante *uvr3* drei mal (Jiang *et al.*, 1997a). *At-PHR1* gehört zu den Klasse II CPD Photolyasen und bindet, in *E. coli* exprimiert, FAD als katalytisch aktiven Kofaktor. Ein Antennenpigment konnte in der rekombinanten Photolyase nicht nachgewiesen werden. Dieses Protein ist auch nicht mit MTHF oder 8-HDF rekonstituierbar (Kleiner *et al.*, 1999). Waterworth *et al.* (2002) haben *At-PHR1* aus einem *Arabidopsis* Gesamtproteinextrakt immunopräzipitiert und fluoreszenzspektroskopisch MTHF nachgewiesen. Jedoch hat das FAD Anregungsspektrum nur ein Maximum bei 450 nm nicht aber im UV-A Bereich. Dies wäre zu erwarten gewesen, wenn MTHF mit einem Absorptionsmaximum bei 380 nm in der proteingebundenen Form als Antenne für FAD dienen würde. Darum erscheinen diese Daten wenig glaubhaft. Aktionsspektren der CPD-Photolyaseaktivität in *Sorghum bicolor* (Hirse) und *Cucumis sativus* (Gurke) zeigen ein Maximum bei 400 nm, was weder einer Photolyase mit Pterinantenne und einem Aktivitätsmaximum bei 380 nm, noch einer mit Deazaflavinantenne und einem Aktivitätsmaximum bei 440 nm entspricht (Hada *et al.*, 2000b). In Reis ist die CPD-Photolyase Expression gewebsspezifisch. In sich teilendem Gewebe ist sie geringer als in adultem Gewebe wie Blättern. Gegenteilig verhält es sich mit NER und BER Faktoren, die in sich teilendem Gewebe stärker exprimiert werden als in adultem Gewebe (Kimura *et al.*, 2004).

#### 1.4.2.3 DNA Reparatur in Organellen

Über ihr Kerngenom hinaus besitzen Pflanzen mit Mitochondrien und Plastiden zwei weitere Genome, deren DNA durch UV geschädigt werden kann. Da diese Genome für essenzielle Gene der Photosynthese, der Respiration und weiterer Funktionen wie Aminosäurebiosynthese kodieren, müssen auch sie entsprechend repariert werden. Hinzu kommt noch, dass die Elektronentransportprozesse in beiden Organellen große Mengen an ROS erzeugen. In den Genomen der Organellen konnten bis heute keine DNA-Reparaturfaktoren identifiziert werden, sodass sie auch in diesem Punkt vom Kerngenom abhängig sind (O'Brien *et al.*, 2009). DNA-Reparatur in den Organellen von Pflanzen ist bis heute wenig erforscht (Nielsen *et al.*, 2010). Da die Genome von Mitochondrien und Plastiden hochgradig polyploid sind, bietet einen gewissen Schutz für die genetische Information (Oldenburg & Bendich, 2004) und ermöglicht es, diese durch Rekombination zu reparieren. Rekombination ist der wichtigste und am besten erforschte Reparaturweg in pflanzlichen Organellen (Maréchal & Brisson, 2010). *Arabidopsis* besitzt ein RecA Homolog für Plastiden und für Mitochondrien (Shedge *et al.*, 2007; Rowan *et al.*, 2010). Eine Nullmutante des *RecA2* Gens, dessen Genprodukt in beiden Organellen lokalisiert ist, ist für Pflanzen letal (Nielsen *et al.*, 2010). Zudem sind für beide Organellen BER Faktoren charakterisiert (Balestrazzi *et al.*, 2011). In zahlreichen Berichten wurde gezeigt, dass es eine Licht- und Photolyase-abhängige Reparatur von DNA-Schäden in den Organellen gibt (Yasui *et al.*, 1992; Stapleton *et al.*, 1997; Draper & Hays, 2000; Petersen & Small, 2001). In keiner dieser Studien wurde jedoch eine Lokalisation von Photolyasen in den Organellen gezeigt. In

*Glycine max* (Soja) wird das Plastidengenom zwar lichtabhängig repariert, jedoch unterscheidet sich die Reparaturkinetik deutlich von der des Kerngenoms (Cannon *et al.*, 1995). Dieses wird sofort nach der UV-Bestrahlung innerhalb einer Stunde lichtabhängig fast vollständig repariert, wohingegen die Reparatur des Plastidengenoms erst vier Stunden nach der UV-Bestrahlung beginnt. Dies macht eine direkte Reparatur des Plastidengenoms durch die auch im Kern aktive Photolyase sehr unwahrscheinlich. In isolierten *Spinacia oleracea* (Spinat) Plastiden konnte keine Photolyaseaktivität nachgewiesen werden (Hada *et al.*, 2000a). Für isolierte Mitochondrien von *Xenopus laevis* (Krallenfrosch) konnte dieses jedoch gezeigt werden (Ryoji *et al.*, 1996).

#### 1.4.2.4 Regulation der Anpassungen

Die Anpassungen an UV-Stress werden auf zwei Wegen vermittelt: Zum einen sekundär durch die Perzeption von UV-Photoprodukten, zum anderen primär durch direkte Perzeption des UV oder längerwelliger Photonen aus dem polychromatischen Sonnenlicht.

Als UV-abhängig entstandene Produkte werden DNA-Schäden und ROS von der Pflanze perzipiert. In Hefe und Säugerzellen gibt es Systeme, die den Zustand der DNA überwachen, nötigenfalls Faktoren für die DNA-Reparatur induzieren und den Zellzyklus arretieren (Sancar *et al.*, 2004). Mehrere homologe Komponenten dieser Signalwege konnten in Pflanzen identifiziert werden, was nahelegt, dass Pflanzen über ähnliche Mechanismen verfügen (Jenkins, 2009). Wie Starklicht sind ROS für Pflanzen nicht nur Stressoren, sondern auch eine wichtige Informationsquelle. Über bis heute nicht identifizierte Rezeptoren sind Pflanzen in der Lage, ROS zu detektieren und ein komplexes Netzwerk von mindestens 152 Genen zu regulieren, die den *steady-state level* von ROS in den Zellen steuern. Dies dient vor allem der Abwehr oxidativer Schäden, spielt aber auch bei der Entwicklung der Pflanze eine Rolle (Mittler *et al.*, 2004).

Licht ist wahrscheinlich das wichtigste abiotische Signal im Lebenszyklus einer Pflanze. Gut ein Drittel aller Gene des pflanzlichen Genoms werden durch Licht reguliert (Ma *et al.*, 2001). Für die Anpassungen an UV-Belastungen nutzen Pflanzen drei verschiedene Photorezeptorsysteme, das Rotlicht-sensitive Phytochromsystem (Franklin & Quail, 2010), das Blaulicht-sensitive Cryptochromsystem (Yu *et al.*, 2010) und das UV-B sensitive UVR8-System mit dem erst kürzlich identifizierten UV-B Rezeptor UVR8 (Rizzini *et al.*, 2011). Darüber hinaus besitzen Pflanzen mit den Phototropinen und den Mitgliedern der Zeitlupefamilie zwei weitere blaulichtsensitive Photorezeptorsysteme. Phototropine regulieren neben dem Phototropismus auch photonastische Anpassungen wie das Öffnen und Schließen der Stomata und die lichtabhängige intrazelluläre Bewegung der Chloroplasten (Christie, 2007). Die Mitglieder der Zeitlupefamilie hingegen vermitteln den Lichteingang in die circadiane Uhr und haben eine zentrale Funktion bei der Blühinduktion (Demarsy & Fankhauser, 2009). Eine Schlüsselrolle bei der Signaltransduktion spielen die negativen Regulatoren der Photomorphogenese *DET1* (Chory & Peto, 1990) und *COP1* (Ang *et al.*, 1998). *DET1* ist ein nukleäres Protein ohne Homologie zu Proteinen mit bekannter Funktion (Castells *et al.*, 2010). Es bildet einen Komplex mit *COP10*, dessen Ubiquitinligase-Aktivität es moduliert und über den es *in vivo* mit *COP9* und *COP1* interagieren kann (Yanagawa *et al.*, 2004). Weiterhin interagiert es mit den NER-Faktoren *DDB2* und *DDB1A* und ist so wahrscheinlich an der DNA schadensabhängigen Regulation des Zellzyklus beteiligt (Al Khateeb & Schroeder, 2007; Castells *et al.*, 2011). *COP1* ist eine Ringfinger E3 Ubiquitinligase, die durch Polyubiquitinierung spezifisch Transkriptionsfaktoren für den Abbau durch das 26S Proteasom markiert (Jiao *et al.*, 2007). Seine Ubiquitinligase-Aktivität

wird lichtabhängig inhibiert (Subramanian *et al.*, 2004). HY5, ein bZIP Transkriptionsfaktor, ist eines mehrerer COP1 Substrate. Im Dunkeln wird HY5 durch COP1 polyubiquitiniert und durch das 26S Proteasom abgebaut und somit inaktiviert (Osterlund *et al.*, 2000). Der UV-B Rezeptor UVR8 (Kliebenstein *et al.*, 2002; Rizzini *et al.*, 2011), der lichtabhängig mit COP1 interagiert, hat ebenfalls einen stabilisierenden Einfluss auf HY5 (Favory *et al.*, 2009). Dieses basiert aber wahrscheinlich vornehmlich auf der COP1 und UVR8-abhängigen verstärkten Expression des *HY5* Gens (Brown *et al.*, 2005). HY5, das an etwa 20% aller lichtregulierten Promotoren bindet, ist ein zentraler Faktor der Photomorphogenese (Ma *et al.*, 2002; Jiao *et al.*, 2007) und der UV-B abhängigen Stressadaptation (Brown *et al.*, 2005). Er bindet spezifisch an G-Boxen in den Promotorregionen der regulierten Gene und fördert ihre Transkription (Chattopadhyay *et al.*, 1998). Der basische Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor PIF3, ein negativer Regulator der Photomorphogenese, bindet ebenfalls an G-Boxen. Er wird Licht- und Phytochrom-abhängig phosphoryliert und daraufhin polyubiquitiniert und vom Proteasom abgebaut (Al-Sady *et al.*, 2006). G-Boxen finden sich in vielen Promotoren von UV-Resistenzgenen, wie der Chalconsynthase (*CHS*) und weiteren Enzymen der Flavonoidbiosynthese (Faktor *et al.*, 1997; Wade *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2005) oder der *At-PHR1* (Sakamoto *et al.*, 1998). Dieses regulative Netzwerk erlaubt es Pflanzen, sich optimal an die an ihrem Standort herrschenden Lichtbedingungen anzupassen. So passen Pflanzen ihren Flavonoidgehalt direkt an die herrschende UV-Belastung an, was zu großen Schwankungen des Flavonoidgehalts über den Tag führt (Veit *et al.*, 1996).

#### 1.4.2.5 DNA Reparatur und UV-Resistenz bei Pflanzen

Die durch das Ozonloch steigende UV-Belastung von Nutzpflanzen und die hieraus resultierende reduzierte Produktivität der Pflanzen könnte zu Nahrungsmittelknappheit führen. Hier könnte Gentechnologie die vorhandenen klassischen Züchtungsmethoden sinnvoll ergänzen, da mit ihr schnell nützliche Eigenschaften in Pflanzen eingebracht werden können (Kimura & Sakaguchi, 2006). Es ist sowohl durch die Optimierung der UV-Abschirmung als auch durch die Verbesserung der DNA-Reparatur möglich, die UV-Toleranz von Pflanzen zu verbessern. Die *Arabidopsis* Mutanten *myb4* und *ugt1* zeigen eine deutlich erhöhte Produktion von Phenylpropanoiden, was zu einer erhöhten UV-Toleranz führt (Jin *et al.*, 2000; Bieza & Lois, 2001). Auch ist UVR8 und die ihm folgende Signaltransduktionskette ein mögliches Ziel für eine gentechnische Veränderung zur Erhöhung des Phenylpropanoidgehaltes. Da viele Phenylpropanoide vom Menschen aber als stark bitter schmeckend empfunden werden (Drewnowski & Gomez-Carneros, 2000), scheinen diesem Weg Grenzen gesetzt, da er die Qualität der Produkte senkt. Die Verbesserung der DNA-Reparatur wäre frei von diesem Nachteil. Hier ist es sowohl möglich, in die Regulation der Reparaturwege einzugreifen, als auch einzelne Komponenten der Reparaturwege verstärkt zu exprimieren. Die *Arabidopsis* Mutante *uvi1*, welche einen Defekt in einem bis heute unbekannten negativen Regulator der DNA-Reparatur trägt, zeigt sowohl eine verbesserte Photoreparatur von CPDs, die mit der Expressionsrate der *At-PHR1* korreliert ist, als auch eine verbesserte Dunkelreparatur von (6-4)PPs. Dies resultiert unter UV-Stress in einem verdoppelten Frischgewicht der Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp (Tanaka *et al.*, 2002). Die Mutation des *HY5* Gens und des HYH Repressors *DET1* führt zu einer erhöhten *At-PHR1* und *At-UVR3* Expression und zu einer verstärkten Akkumulation von Phenylpropanoiden durch erhöhte Chalconsynthase-Expression. Die verbesserte Photoreparatur des Genoms und der erhöhte Schutz der Pflanze durch die zusätzliche Abschirmung resultieren in einer UV-C Hyposensitivität (Castells *et al.*, 2010). Die Überexpression von DDB1A in *Arabidopsis* erhöht

ebenfalls die UV-Toleranz, indem es die NER Aktivität gegenüber CPDs und (6-4)PPs deutlich erhöht (Al Khateeb & Schroeder, 2009).

## 1.5 Zielsetzung

Klasse I und Klasse II CPD-Photolyasen haben eine identische biologische Funktion, nämlich die Licht-abhängige Reparatur von Cyclobutanpyrimidindimeren, zeigen aber interessanterweise in ihrer Aminosäuresequenz die größten Unterschiede innerhalb der Photolyase Cryptochrom Familie. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob und wie sich die deutlichen Unterschiede in den Primärstrukturen dieser beiden CPD-Photolyase Klassen auf ihre räumliche Struktur auswirken. Dazu sollte die Klasse II CPD-Photolyase aus *Arabidopsis thaliana* (At-PHR1) rekombinant in *E. coli* überexprimiert und gereinigt werden. Durch Proteinkristallisation und Röntgenbeugung sollte dann die räumliche Struktur des Enzyms aufgeklärt und mit den bekannten Strukturen von Klasse I CPD-Photolyasen verglichen werden.

Als unabhängig von anderen Proteinen, fehlerfrei und energieneutral arbeitendes DNA-Reparatursystem könnten sich Photolyasen besonders für die biotechnologische Verbesserung der UV-Toleranz eignen. Technisch nutzbar gemacht könnten sie so helfen, den negativen Folgen einer erhöhten UV-B Belastung auf der Erde entgegen zu wirken. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Überexpression der Klasse II CPD-Photolyase in Pflanzen zu einer gesteigerten Reparatur von CPD-Läsionen führt und dies in einer erhöhten UV-Toleranz resultiert. Die Überexpression von Photolyase hat folgende Vorteile gegenüber den obenstehenden (Kap. 1.4.2.5) Ansätzen: (i) DNA Reparatur durch Photolyasen ist, im Gegensatz zu den Exzisionsreparaturwegen, nur von einem einzelnen Enzym und seinen Cofaktoren abhängig und benötigt somit keine weiteren Proteine. Dies erlaubt eine einfache Vorgehensweise, nämlich die Expression nur dieses Gens unter Kontrolle eines starken konstitutiven Promotors. (ii) CPDs, die Hauptprodukte der UV-abhängigen DNA Schädigung mit stark negativen Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum, werden von der At-PHR1 effektiv repariert. (iii) Es wurde bereits gezeigt, dass CPD Photolyase effektiv CPDs aus dem Pflanzengenom entfernt. (iv) Die DNA Reparatur durch Photolyasen ist direkt und fehlerfrei. Da die Photoreaktivierung ohne eine Neusynthese des geschädigten DNA Stranges funktioniert, ist sie energie-neutral (Kaiser *et al.*, 2009). (v) Soweit bekannt, ist At-PHR1 anders als DDB1A nicht an regulativen Prozessen beteiligt, sodass aus der Überexpression keine weiteren Folgen als eine verbesserte DNA-Reparatur resultieren sollten. Als gängiger pflanzlicher Modellorganismus, für den zudem eine Nullmutante für die endogene CPD-Photolyase vorhanden ist, wurde *Arabidopsis thaliana* für diese Experimente gewählt.

In *Escherichia coli* rekombinant überexprimiert bindet die CPD-Photolyase aus *Thermus thermophilus* FMN als zweiten Kofaktor. Die Aminosäure Arginin 46 scheint hierbei eine Schlüsselrolle zu spielen. Im dritten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss die gezielte Mutation von Arginin 46 zu Glutamat auf die FMN-Bindung hat und wie sich das mögliche Fehlen des Antennenpigmentes auf die photochemischen Eigenschaften der Photolyase auswirkt. Wäre FMN ein funktionelles und austauschbares Antennenpigment, könnten so die photochemischen Eigenschaften von Photolyasen gezielt verändert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Gerät	Zubehör	Typenbezeichnung (Hersteller)
Autoklav		V-150 (Systec, Wetztenberg)
Digitalkamera		Coolpix 5000 (Nikon, Tokio, Japan)
French-press		Typ 5-598AE (American Instrument Company <sup>1</sup> )
Heizblock		Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg)
Inkubatorschrank		B6060 (Heraeus, Hanau)
Inkubatorschüttler		G25 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA)
		Multitron m. Kühlung (Infors Bottmingen, Schweiz)
Klimakammer		(York International, Mannheim)
Klimaschrank		AR-75R (CLF Plant Climatics, Emersacker)
Küvetten		101-QS, 104-QS und 105.250-QS (Helma, Müllheim)
PCR Cycler		Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg)
qPCR Cycler		Mastercycler gradient S mit realplex <sup>2</sup> (Eppendorf, Hamburg)
pH-Meter		CG 825 (Schott, Mainz)
	Elektrode	InLab Easy pH (Mettler-Toledo, Giessen)

Photometer		UV 2401PC (Shimadzu, Kyoto, Japan)
	Software	HyperUV 1.5 (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Pipetten		Research variable 2,5, 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 und Research variable Multi Channel 8 300 (Eppendorf, Hamburg)
Schüttler		3005 und 3025 (GFL, Burgwedel)
Schwingbecher Mühle		MM200 (Retsch, Haan)
Sterilbank		Aura-H (Ehret, Freiburg)
Sterilbank		(Prettl Laflow Prozess-Technik <sup>1</sup> )
Voretex		Voretex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)
Wagen	Feinwage	(Satorius, Göttingen)
	Analysewage	770-14 (Kern, Balingen-Frommern)
Wasserbad		1003 (GFL, Burgwedel)
		1083 (GFL, Burgwedel)
Zentrifuge		Centrifuge 5417 R (Eppendorf, Hamburg)
	Rotor	F45-30-11 (Eppendorf, Hamburg)
		Labofuge 400 R (Heraeus, Hanau)
	Rotor	# 8179 und # 3354 (Heraeus, Hanau)
		J2-21 (Beckman, Fullerton, CA, USA)
	Rotor	JA 20, JA 14 (Beckman, Fullerton, CA, USA) und FiberLite F10-6x500 (Piramoont Technologies, Santa Clara, CA, USA)
		Centrikon T-1080 (Kontron <sup>1</sup> )
	Rotor	TFT 70.38 (Kontron <sup>1</sup> )

Tabelle 2.1 Allgemeine Laborgeräte

<sup>1</sup> Firma nicht mehr existent



### 2.1.1.1 Photobiologisches Gerät

Gerät	Zubehör	Typenbezeichnung (Hersteller)
Sicherheitslicht gelb		36W/62 Yellow (Osram, München)
Sicherheitslicht rot		TLD 18W/15 (Philips, Amstelveen, Niederlande)
Ultraviolett-A		L36W/73 (Osram, München)
Ultraviolett-B		Ultraviolett-B TL 40W/12 RS (Philips, Amstelveen, Niederlande)
Diaprojektor		Prado Universal (Leica, Wetzlar) mit 250W Halogenleuchtmittel (Osram, München)
Xenon-Lichtbogenlampe	Gleichrichter	XEGA 80R (Jovyatlas, Leer)
	Träger	Typ 0103 (Schoeffel Instruments <sup>1</sup> )
	Leuchtmittel	XBO 1600 W (Osram, München)
Optometer		P-2000 (Gigahertz-Optik, Puchheim)
	Detektor	PD-9306-2 (Gigahertz-Optik, Puchheim)
Quantenphotometer		LI-185B (Li-Cor, Lincoln, NE, USA)
	Detektor	LI-190SB (Li-Cor, Lincoln, NE, USA)
alle Interferenz und Langpassfilter		(Schott, Mainz)

**Tabelle 2.2 Photobiologisches Gerät**

<sup>1</sup> Firma nicht mehr existent

### 2.1.1.2 ÄKTA Purifier

Für die Durchführung von FPLC- und HPLC Experimenten wurde ein ÄKTA Purifier von GE Healthcare (Freiburg) eingesetzt. Er besteht aus einer Hauptpumpe P-900, deren Pumpen A und B aus je zwei 100er Pumpenköpfen mit passiven Ventilen bestehen. Die Pumpen erreichen eine maximale Pumpleistung von 100 ml/min bei einem maximalen Druck von 10 MPa. Die einzelnen Pumpenköpfe verfügen über eine aktive Hintergrundspülung. Den Pumpen A und B ist jeweils ein Zweiwege-Membranventil vorgestellt, sodass bis zu vier Laufmittel gleichzeitig genutzt werden können. Die von den beiden Pumpenköpfen geförderte Flüssigkeit wird in einem Y-Stück zusammengeführt und dort bei Pumpe A der Systemdruck abgenommen. Im nachgestellten Mixer M-925 wird das von Pumpe A und B geförderte Laufmittel durch einen Magnetrührer in einer 5 ml Kammer zum Laufmittelgemisch vereinigt. Von hier aus passiert es einen Inlinefilter, der alle weiteren Komponenten vor eventuell noch vorhandenen Partikeln schützt. Das sich anschließende Injektionsventil INV-907 hat gegenüber herkömmlichen HPLC Injektionsventilen den Vorteil, dass es zusätzlich zur Load- und Injektposition eine Wastefunktion hat. Hiermit kann das

Laufmittel, zum Spülen des Systems, direkt, ohne den Umweg über die Probenschleife, in den Abfall gepumpt werden. Dem Injektionsventil schließt sich ein Säulenkranz bestehend aus zwei Achtwegeventilen PV-908 an. Hier können, neben dem *Bypass*, sieben Säulen angeschlossen werden. Die die Säulen oder den *Bypass* verlassende Flüssigkeit passiert eine 2 mm Durchflusssküvette, an der mithilfe des UV-900 Detektors die Absorption bei drei verschiedenen Wellenlängen zwischen 200 und 800 nm sequenziell gemessen werden kann. Hieran schließt sich eine Leitfähigkeits- und Temperaturmesszelle an, die am Detektor pH/C-900 angeschlossen ist. Die diesem Detektor zugehörige pH-Elektrode wurde während der Experimente für diese Arbeit nicht genutzt. Das Flussschema der Anlage findet ein Ende in einem weiteren Achtwegeventil PV-908 an dem eine Wastekapillare und der Fraktionskollektor Frac-950 angeschlossen sind. Hier können, an den freien Positionen des Ventiles, auch größere Fraktionen in Flaschen gesammelt werden. Zusätzlich ist die Maschine mit einer Ladepumpe P-960 für das Auftragen großer Probenmengen oder das automatische Laden der Probenschleife ausgestattet. Dieser ist zudem ein weiteres Achtfachventil PV-908 vorgestellt, um verschiedene Proben automatisch auftragen zu können. Gesteuert wird die Anlage mit der Unicorn Software Version 5.0. Die Verbindung zwischen Computer und ÄKTA übernimmt die Connection Unit CU-950.

### 2.1.1.3 Mikroskope

Für einfache mikroskopische Untersuchungen wurde ein Leica (Wetzlar) MZ 8 Stereomikroskop, ein inverses Leitz (heute Leica, Wetzlar) Diavert Mikroskop mit Phasenkontrast-Optik, und ein einfaches Lichtmikroskop von Reichert (heute Leica, Wetzlar) mit Köhlerscher Beleuchtung genutzt.

Epifluoreszenz-Mikroskopie wurde mit einem Leitz (heute Leica, Wetzlar) Ortholux II mit Interferenzkontrast-Optik durchgeführt. Die Objektive sind für die Fluoreszenzmikroskopie UV-durchlässig und das Mikroskop mit den Filtersystemen A, G, I2 und M2 (alle Leitz heute Leica, Wetzlar) ausgestattet. Als Lichtquelle dient wahlweise eine 12 V, 100 W Halogenbirne (Philips, Amstelveen, Niederlande) oder eine 150 W XBO Xenonlichtbogen-Lampe (Osram, München). Um das Objekt vor zu starker UV-Strahlung zu schützen ist der Lichtbogenlampe ein UV-Sperrfilter nachgestellt.

Für die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie wurde ein TCS SP2 Scankopf auf einem aufrechten DM RE Stativ mit Interferenzkontrast-Optik und den Objektiven HCX PL APO 40x/1,25-0,75 Oil CS und PL APO 63x/1,32-0,6 Oil Ph3 CS verwendet. Für die Durchlicht-Mikroskopie dient eine Halogenbirne als Lichtquelle. Für die Epifluoreszenz-Mikroskopie ist das Mikroskop mit einer 50 W HBO Quecksilberdampf Lampe, und den Filtersystemen I 3 und N 2.1 ausgestattet. Im konfokalen Betrieb wurde ein 65 mW Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm zur Fluoreszenzanregung eingesetzt. Sowohl Laser als auch Scankopf wurden über einen PC mit der Confocal LCS Software gesteuert. Der Scankopf kann bis zu drei Fluoreszenzkanäle und einen zusätzlichen Durchlicht Kanal simultan aufzeichnen. Die Wellenlängen für die drei Fluoreszenzkanäle können zwischen 400 und 850 nm frei gewählt werden, wobei sich die einzelnen Kanäle jedoch nicht überlappen können. Alle Komponenten des Mikroskops sind von Leica (Wetzlar).

### 2.1.1.4 Software

Für die statistische Auswertung von linearen Regressionen wurde Origin 7.5 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA) genutzt.

## 2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen) oder Applichem (Darmstadt) in analytischer Qualität bezogen. Laborverbrauchsmittel wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Einmalküvetten von Sarstedt (Nümbrecht).

## 2.1.3 Plasmide, Gene und Oligos

### 2.1.3.1.1 Plasmide

Die Plasmide pGEM-T, pQE31, pREP4, pAVA393 und pPCV812 wurden während der Arbeit verwendet.

pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA) ist ein PCR-Entry-Vector. Seine T-Überhänge ermöglichen es leicht PCR-Produkte mit A-Überhängen hinein zu ligieren und verhindern ein religieren des Vektors. Die *Multible-Cloning-Site* (MCS) wird vom LacZ-Gen flankiert, sodass ein *Blue/White Screening* durchgeführt werden kann. Die MCS wird von dem Sequenzier-Primerpaar pUC/M13 GEM-T flankiert und erlaubt so die einfache Kontrolle der Sequenz des inserierten PCR-Produkts. pGEM-T vermittelt Ampicillinresistenz.

pQE31 ist ein Expressionsvektor für *E. coli*. Um eine starke Transkription des Zielgens zu erreichen, ist er mit einem T5-Promotor ausgestattet, der durch die *E. coli* RNA-Polymerase erkannt wird. Diesem folgen zwei Laktose Repressor Bindestellen, die die Regulation der Transkription ermöglichen. Um eine optimale Translation zu gewährleisten, folgt diesen eine synthetische RBS II Ribosomenbindestelle. Das anschließende Startcodon initiiert dann die Translation des folgenden 6x His-tags. Diesem ist eine MCS angeschlossen, in die das Zielgen inseriert und so n-terminal mit dem His-tag fusioniert wird. Der MCS folgt dann eine Stoppkassette für den sicheren Abbruch der Translation. Für einen zuverlässigen Abbruch der Transkription sorgen sowohl ein T<sub>0</sub> als auch ein T1 Terminator, die der Stoppkassette folgen. Der dem Expressionssystem zugehörige Vektor pREP4 stellt den Laktose Repressor konstitutiv zur Verfügung, um den starken T5-Promotor ausreichend zu reprimieren. pQE31 vermittelt Ampicillin- und pREP4 Kanamycinresistenz.

pAVA393 ist ein Vektor für die transiente Expression von GFP-Fusionsproteinen in Pflanzen. Er ist ein pBluescript SK Derivat (Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Für die Expression des Fusionsproteins in Pflanzen wurde in den Stammvektor an der PstI Schnittstelle ein Cauliflower Mosaic Virus 35S-Promotor Tandem (Fang *et al.*, 1989), ein Translational Enhancer, ein Hybriden aus GFP (Shimomura *et al.*, 1962) und GFP5 (Prasher *et al.*, 1992) und ein Cauliflower Mosaic Virus 35S-Terminator eingesetzt. Durch eine NcoI Schnittstelle im Startcodon und eine BglII und XbaI Schnittstelle vor dem Stoppcodon des GFPs kann dieses N- oder C-terminal mit dem Zielgen fusioniert werden. Als pBluescript Derivat vermittelt pAVA393 Ampicillinresistenz.

Das Konstrukt pPCV812 2x35S::At-*PHR1* (Kaiser *et al.*, 2009) diente als Template für die Synthese der Sonde für den Southern Blot.

## 2.1.3.1.2 Gene

Abkürzung	Bezeichnung	Ursprung	Genbank	TAIR
<i>At-PHR1</i>	Klasse II CPD Photolyase (Ahmad <i>et al.</i> , 1997)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_101109.1	At1g12370
<i>At-UBQ</i>	Zusammenfassung für:  <i>UBQ10</i>  <i>UBQ11</i>  <i>UBQ14</i> (Sun <i>et al.</i> , 1997; Iida <i>et al.</i> , 2009)	<i>Arabidopsis thaliana</i>  <i>Arabidopsis thaliana</i>  <i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_116771.5  U84969.1  AK316842.1	At4g05320  At4g05050  At4g02890
<i>Tt-PHR</i>	Klasse I CPD Photolyase (Kato <i>et al.</i> , 1997; Komori <i>et al.</i> , 2001)	<i>Thermus thermophilus</i>	AB064548.2	
<i>GFP</i> <sup>1</sup>	Grün Fluoreszierendes Protein (Prasher <i>et al.</i> , 1992; Siemering <i>et al.</i> , 1996)	<i>Aequorea victoria</i> & Synthetisches Konstrukt	M62653 & U87973	
<i>HPT</i>	Hygromycin B Phosphotransferase (Gritz & Davies, 1983)	Plasmid pJR225 aus <i>Escherichia coli</i>	K01193.1	

**Tabelle 2.3 Verwendete Gene**

Genbank Genbank Accessionnummer; TAIR TAIR Gennummer; <sup>1</sup> Das verwendete GFP ist ein Hybrid aus Wildtyp *Aequorea victoria GFP* (M62653), das an Position His77 mit der NdeI-Schnittstelle mit *GFP5* (U87973) fusioniert wurde.

## 2.1.3.1.3 Oligos

Funktion	Bezeichnung	Sequenz	Template	Accession / TAIR	Pos	PL
qRT-PCR von <i>At-PHR1</i>	RT <i>At-PHR1</i> F	TGG GTC CCG TCG TTT ACT GG	<i>At-PHR1</i>	NM_101109.1 / At1g12370	189 / 189	
	RT <i>At-PHT1</i> R1	GCG CGT TGG TTC TGT TTG CC	<i>At-PHR1</i>	NM_101109.1 / At1g12370	284	95
	RT <i>At-PHR1</i> R2	ATG GGT TTG GTG TGA GAT CG	<i>At-PHR1</i>	At1g12370	452	263
qRT-PCR von <i>At-UBQ</i>	RT <i>At-UBQ</i> F	CGG GAA AGA CGA TTA CTC TTG AGG	<i>At-UBQ10</i>	NM_116771.5	339	
			<i>At-UBQ11</i>	U84969.1	254	
			<i>At-UBQ14</i>	AK316842.1	322	
	RT <i>At-UBQ</i> R	GCA AGA GTT CTG CCA TCC TCC	<i>At-UBQ10</i>	NM_116771.5	483	144
			<i>At-UBQ11</i>	U84969.1	398	144
			<i>At-UBQ14</i>	AK316842.1	466	144
Southern Blott Sonde gegen <i>HPT</i> aus pPCV812 2x35S:: <i>At-PHR1</i>	HPT F	GCG ATC GCT GCG GCC GAT CT	<i>HPT</i>	K01193.1	571	
	HPT R	CTT TGC CCT CGG ACG AGT GC	<i>HPT</i>	K01193.1	1230	659
Klonierung von <i>At-PHR1</i> in pAVA393	<i>At-PHR1</i> => pAVA393 F	<u>CC ATG</u> GCG TCG ACA GTC TC	<i>At-PHR1</i>	NM_101109.1	110	
	<i>At-PHR1</i> => pAVA393 R	<u>CC ATG</u> GAA ACA ATA GTT ATC TTG GG	<i>At-PHR1</i>	NM_101109.1	1580	1470

**Tabelle 2.4 Verwendete Oligonukleotide**

*Pos* Position im Template in bp; *PL* Produktlängen in bp; *Accession* Genbank Accessionnummer für cDNA; *TAIR* TAIR Gennummern für genomische Sequenzen; **Startcodon**; NcoI Schnittstelle; Alle Oligonukleotide wurden über MWG (Ebersberg) bezogen.

## 2.1.4 Organismen

### 2.1.4.1 *Escherichia coli*

Seit es 1973 (Cohen *et al.*, 1973) zum ersten Mal gelang ein funktionelles bakterielles Plasmid *in vitro* zu konstruieren und in *E. coli* einzubringen, ist *E. coli* aus der Molekularbiologie nicht mehr wegzudenken. Durch die sehr gute genetische Zugänglichkeit, eine große Anzahl von für molekularbiologische Aufgaben maßgeschneiderten Laborstämmen und der einfachen Präparierbarkeit von Plasmid DNA, wurden alle Modifikationen von DNA in dieser Arbeit an *E. coli* Plasmiden vorgenommen.

### 2.1.4.2 *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* wurde im 16. Jahrhundert von Johannes Thal im Harz entdeckt. Sie ist eine krautige, einjährige Brassicaceae die bis zu einer Höhe von 30 cm und einem Rosettendurchmesser von 10 cm heranwächst. Die natürliche Verbreitung erstreckt sich über Asien, Nordamerika und Europa, sodass viele Ökotypen bekannt sind. Die Blühinduktion erfolgt fakultativ im Langtag. Die typischen Brassicaceae Blüten haben einen Durchmesser von ~3 mm und können selbstbestäuben. Bestäubte Blüten bilden Schoten von einer Länge bis zu 20 mm die 20-30 Samen enthalten. Durch die vielen Blüten, die *Arabidopsis* anlegt, produziert eine einzelne Pflanze etwa 5000 Samen. Die Generationszeit beträgt etwa sechs Wochen (Meinke *et al.*, 1998).

1943 wurde *Arabidopsis thaliana* von Friedrich Laibach (Meyerowitz, 2001) als genetischer Modellorganismus für die Pflanzenforschung vorgeschlagen. Die bis heute geltenden Gründe hierfür waren: (i) Der geringe Platzbedarf der kleinen Pflanze, (ii) die kurze Generationszeit, (iii) die Fähigkeit zur Selbstbestäubung, (iv) die hohe Samenproduktion sowie (v) die gute Kreuz- und Mutierbarkeit. Heute ist *Arabidopsis* einer der wichtigsten pflanzlichen Modellorganismen, wobei die Ökotypen Landsberg erecta und Columbia von besonderer Bedeutung sind. Das 125 MB große, auf fünf Chromosomenpaare (2n=10) verteilte Genom des Columbia Wildtyps ist vollständig sequenziert (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Aus dem Genomprojekt stammt eine vollständige Sammlung von YACs und BACs sowie eine große Sammlung von cDNA. Durch die lange Geschichte von *Arabidopsis* als genetischer Modellorganismus steht eine sehr große Zahl von Mutanten zur Auswahl. Zudem ist *Arabidopsis*, für eine Pflanze, genetisch gut zugänglich und es gibt eine große Zahl von etablierten und robusten Standardmethoden.

Eine der im Landsberg erecta Hintergrund zur Verfügung stehenden Mutanten ist die 1997 beschriebene Mutante *uvr2-1* (Landry *et al.*, 1997). Sie trägt eine Deletionsmutation des mittleren Guanins des 28. Codons des *At-PHR1* Genes. Dies führt zu einem Frameshift und einer verfrühten Termination in Codon 40 (Ahmad *et al.*, 1997). Da ihr ein funktionelles Allel des *At-PHR1* Gens fehlt, wurde sie im Rahmen dieser Arbeit als Negativkontrolle verwendet.

Da die stabile Transformation von *Arabidopsis* Pflanzen einen großen Aufwand an Zeit und Material erfordert, wurde für die Lokalisationsstudien eine *Arabidopsis* Mesophyllzellkultur verwendet. Diese kann, in für die Experimente in ausreichender Menge, innerhalb eines Tages transient transformiert werden und lässt sich gut mikroskopieren.

## 2.2 Kulturhaltung

### 2.2.1 *Escherichia coli*

Die allgemeinen Kulturbedingungen für *E. coli* waren 37°C, 200 rpm im Inkubationsschüttler für Flüssigkultur und 37°C im Inkubatorschrank für Plattenkultur. Als Medium wurde LB verwendet, dem für die Plattenkultur vor dem Autoklavieren bei 1,3 bar 1,5 % (w/v) Agar zugegeben wurde. Um eine ausreichende Belüftung des Mediums zu gewährleisten, wurden Kulturflaschen ohne Schikane bis zu einem Viertel, Kulturflaschen mit Schikane bis zu der Hälfte ihres Fassungsvermögens gefüllt. Für Proteinexpressionen wurden sowohl die Zellen der Vor- und der Hauptkultur in TB kultiviert, da dieses dickere Medium eine bessere Expression des Zielproteins ermöglichte.

Medium		g/l
LB	Trypton	10
	Hefeextrakt	5
	NaCl	5
TB <sup>1</sup>	Trypton	12
	Hefeextrakt	24
	Glycerin	5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,3
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16,4
1000x Ampicillin <sup>2</sup>	Ampicillin	100
1000x Kanamycin <sup>2</sup>	Kanamycin	25

**Tabelle 2.5 Lösungen für die *E. coli* Kultur**

<sup>1</sup> Die Salze für das TB-Medium wurden getrennt von den anderen Substanzen gelöst, autoklaviert und das Medium erst kurz vor Gebrauch komplementiert. <sup>2</sup> Die Antibiotikallösungen wurden durch Filtration sterilisiert und bei –20°C gelagert.

### 2.2.2 *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis* Pflanzen wurden in einer Mischung von einem Teil Vermiculit und zwei Teilen Gartenerde kultiviert. Hierzu wurden die Samen direkt in einen Topf mit 8 cm Durchmesser mit der oben genannten Substratmischung gesät und für drei Tage bei 4°C stratifiziert. Anschließend wurden die Töpfe in die Lang- (16 h Licht 180  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 8 h Dunkel) oder Kurztagkammer (10 h Licht 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 14 h Dunkel) verbracht und die Pflänzchen nach etwa zehn Tagen vereinzelt. Zur Samennachzucht wurden die Pflanzen einzeln in 8 cm Töpfe gesetzt und mit Aracon Basis und Röhre (beide Betatech, Gent, Belgien) versehen um Kreuzbestäubungen auszuschließen und im Langtag kultiviert. Zur Produktion von Blattmaterial für Experimente wurden die Pflanzen zu fünft in einen 11 cm Topf vereinzelt und im Kurztag gehalten.

### 2.2.2.1 *Arabidopsis thaliana* Zellkultur

Die grüne *Arabidopsis* Zellkultur wurde mixotroph bei 22°C, 120 rpm,  $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Dauerweißlicht kultiviert. Die Zellen wurden wöchentlich im Verhältnis 1:5 in frisches Medium passiert. Hierfür wurden zu 40 ml frischem Medium in 250 ml Kulturflaschen, 10 ml der alten Kultur pipettiert. Bei allen Arbeitsschritten mit der Zellkultur wurde auf absolut steriles Arbeiten geachtet.

	pro Liter
Saccharose	30 g
MS-Salze	4,3 g
NAA (1-Naphthyllessigsäure)	0,1 mg
Kinetin	0,5 mg
Nikotinsäure (Vitamin B <sub>3</sub> )	1 mg
Pyridoxol HCl (Vitamin B <sub>6</sub> )	1 mg
Thiamin HCl (Vitamin B <sub>1</sub> )	10 mg
Myo-Inositol (früher Vitamin B <sub>2</sub> )	100 mg

**Tabelle 2.6 Kulturmedium für autotrophe *Arabidopsis* Zellkultur**

Das Medium wird mit den Vitaminen für 25 min. autoklaviert.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Grundtechniken

#### 2.3.1.1 Präparation von Plasmiden

##### 2.3.1.1.1 Miniprep

Zur Präparation von Plasmid DNA aus Bakterien in kleinerem Maßstab wurde folgendes Protokoll mit Alkalischer Lyse benutzt (Birnboim & Doly, 1979; Birnboim, 1983). Hierbei werden die Zellen durch SDS und NaOH lysiert. Durch den hohen pH-Wert und das Detergens werden sowohl die Proteine als auch die chromosomale und die Plasmid DNA denaturiert. Durch anschließende Neutralisation mit Kaliumacetat kann die Plasmid DNA zügig renaturieren, während chromosomale DNA, Proteine und das, durch Kalium präzipitierte SDS durch Zentrifugation größtenteils abgetrennt werden können. Die renaturierte Plasmid-DNA wird anschließend durch alkoholische Fällung aus dem Überstand weiter aufgereinigt und aufkonzentriert.

Hierfür wurden 3 ml LB Selektivmedium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 2 ml der Kultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß übertragen und die Zellen durch Zentrifugation (20.000 g, 1 min, RT) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 µl GTE resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Lyse der Zellen wurden 200 µl NaOH/SDS zugegeben und



vorsichtig gemischt. Nachdem die Probe für 5 min auf Eis inkubiert wurde, wurde durch Zugabe von 150 µl PAS neutralisiert. Um chromosomale DNA und Zellreste zu pelletieren, wurde bei 20.000 g für 3 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 µl DNase freie RNase zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend durch Zugabe von 1000 µl Ethanol gefällt und durch Zentrifugation (20.000 g; 1 min; RT) pelletiert. Die Plasmid DNA wurde dann mit 70% Ethanol gewaschen und das Pellet an der Luft oder in der SpeedVac getrocknet und dann in 25 µl TE oder EB aufgenommen.

#### Lösung

<b>GTE</b>	Tris/HCl, pH 8,0	25 mM
	Glukose	50 mM
	EDTA	10 mM
<b>NaOH/SDS</b>	NaOH	0,2 M
	SDS	1 % (w/v)
<b>PAS</b>	Essigsäure	30% (v/v)
	KOH	bis pH 4,8
<b>RNase<sup>1</sup></b>	Ribonuklease A	1 mg/ml
	Tris/HCl, pH 8,0	10 mM
	EDTA	1 mM
<b>TE</b>	Tris/HCl, pH 8,0	10 mM
	EDTA	1 mM
<b>EB</b>	Tris/HCl, pH 8,0	10 mM

**Tabelle 2.7 Lösungen für die Miniprep**

<sup>1</sup> Die RNase Lösung wurde durch dreimaliges Kochen bei 95°C für 15 min von DNase Aktivität befreit.

#### 2.3.1.1.2 Maxiprep

Zur Isolation von größeren Mengen von Plasmid DNA wurde das Plasmid Maxi Kit von Qiagen (Hilden) benutzt. Es basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse, der sich eine weitere Aufreinigung der Plasmid DNA durch eine Anionenaustauschchromatographie anschließt. Das Kit wurde nach den Angaben des Herstellers verwendet:

Für Highcopy Plasmide wurden 100 ml, für Lowcopy Plasmide 500 ml LB Selektivmedium im Verhältnis 1:1000 aus einer Vorkultur angeimpft, und die Kultur über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (6.000 g; 15 min; 4°C) und in 10 ml Puffer 1 (P1) aufgenommen. Nach der Zugabe von 10 ml Puffer zwei (P2) wurde vorsichtig gemischt und die Suspension bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Anschließend wurden 10 ml eiskalter Puffer 3 (P3) zugegeben, vorsichtig gemischt und für

20 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde zentrifugiert (20.000 g; 15 min; 4°C). Während der Zentrifugation wurde ein Qiagen-Tip 500 mit 10 ml Puffer QBT equilibriert, um den Überstand der Zentrifugation sofort auf die Säule auftragen zu können. Nun wurde die Säule zweimal mit je 30 ml Puffer QC gewaschen und die Plasmid DNA anschließend mit 15 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wurde nun durch Zugabe von 10,5 ml 2-Propanol und Zentrifugation (5000 g; 30 min; 4°C) gefällt. Anschließend wurde die DNA mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in EB- oder TE-Puffer aufgenommen.

### 2.3.1.2 Alkoholische Fällung von Nukleinsäuren

Für die quantitative Fällung von Nukleinsäuren wurde 2-Propanol benutzt. Dafür wurde die NaCl Konzentration in der Probe auf mindestens 0,4 M angehoben und dann mindestens 0,7 Volumenteile an eiskaltem 2-Propanol zugegeben. Die Probe wurde für 1 h bei –20°C inkubiert und anschließend die ausgefallene DNA durch Zentrifugation im Eppendorfgefäß (20.000 g; 15 min; 4°C) oder im Corex Röhrchen (12.000 g; 20 min; 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, erneut kurz zentrifugiert und die Waschlösung entnommen. Nach dem Trocknen des DNA-Pellets an der Luft oder in der SpeedVac wurden die Nukleinsäuren in TE oder EB aufgenommen.

### 2.3.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

#### 2.3.1.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren durch Absorptionsspektroskopie

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren durch Absorptionsspektroskopie wurde ein Absorptionsspektrum von 240 - 300 nm aufgenommen. Die Nukleinsäurekonzentration ergibt sich dann aus:

$$A_{260} \cdot 50 = c_{DNA} \left[ \frac{\mu g}{ml} \right]$$

#### Formel 2.1

Wobei  $A_{260}$ , Absorption bei 260 nm;  $c_{DNA}$ , DNA Konzentration

Zudem wurde das Verhältnis 260/280 nm errechnet. Ein Verhältnis von 1,8 darf als optimal gelten. Ein Verhältnis von  $\leq 1,6$  deutet auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin.

#### 2.3.1.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren durch Abschätzen im Gel

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren im Gel wurde die Stärke der Bande einer Probe mit der Stärke einer Bande einer bekannten DNA-Probe ähnlicher Größe im gleichen Gel verglichen.

### 2.3.1.4 Restriktionsverdau

Die für Restriktionsverdau nötigen Enzyme wurden von Fermentas (Vilnius, Litauen) bezogen und nach den Angaben des Herstellers verwendet. Wenn möglich wurden Doppelverdaue gleichzeitig in einem geeigneten Puffer durchgeführt.

### 2.3.1.5 Elektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von DNA nach Größe wurde durch horizontale Agarosegelelektrophorese durchgeführt (eine kurze Einführung in die Elektrophorese findet sich in Kap. 2.4.1.2). Hierfür wurde Agarose (QA-Agarose, molecular biology grade (Qbiogene, Montreal, Kanada)) durch

Kochen in TBE gelöst. Die Agarosekonzentration wurde hierfür an die Größe der zu erwartenden Fragmente angepasst und lag zwischen 0,7 und 2 % (w/v). Zur Färbung der DNA wurde die Agaroselösung, nachdem sie etwas abgekühlt war, bis zu einer Endkonzentration von 0,6 µg/ml mit Ethidiumbromid versetzt. Nun wurde die Agarosemischung in die abgedichtete Gelwanne gegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Proben wurden mit Ladepuffer gemischt, das Gel beladen und bei 80 V konstanter Spannung aufgetrennt.

#### Lösung

<b>TBE</b>	Tris	90 mM
	Borsäure	90 mM
	EDTA	2 mM
<b>Ladepuffer</b>	Glycerin	50% (v/v)
	SDS	1% (w/v)
	EDTA	10 mM
	Bromphenolblau <sup>1</sup>	0,1% (w/v)
	Xylencyanol <sup>1</sup>	0,1% (w/v)

**Tabelle 2.8 Lösungen für die elektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren**

<sup>1</sup> Läuft eine der Farbstoffbanden auf der Größe der zu erwartenden DNA Fragmente, wurde dieser nicht verwendet.

#### 2.3.1.5.1 Isolation aus Gelen

Um die getrennte DNA aus dem Agarosegel zu isolieren, wurde das Qiaex II Gel Extraktion Kit nach den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) genutzt. Hierfür wurde die betreffende Bande mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, die überschüssige Agarose sorgfältig entfernt und das Agarosestück in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 3 µl Puffer QX1 pro mg Agarosegel versetzt. Der Probe wurden 30 µl der DNA bindenden Glasmilch zugesetzt und die Agarose unter gelegentlichem Mischen für 10 min bei 50°C wieder in Lösung gebracht. Durch kurze Zentrifugation wurde die Glasmilch pelletiert, der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Die Glasmilch wurde nun einmal mit 500 µl Puffer QX1 und zweimal mit je 500 µl Puffer PE gewaschen. Nachdem die Glasmilch getrocknet war, konnte die DNA mit 20 µl EB eluiert werden.

#### 2.3.1.6 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit der T4 DNA Ligase (Fermentas, Vilnius, Litauen) im 20 µl Reaktionsansatz durchgeführt. Hierfür wurden der Vektor und das Insert im molaren Verhältnis 1:5 gemischt, 2 µl Reaktions-Puffer, 2 U Enzym und PEG 4000 bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/µl zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde nun über Nacht bei 4°C inkubiert.

### 2.3.1.7 Kompetente Zellen und Transformation

Zur Transformation von kompetenten Zellen wurden diese auf Eis aufgetaut, mit der DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 s bei 42°C wurden die Zellen für 2 min auf Eis abgekühlt und 1 ml LB zugegeben. Nach Inkubation von 1 h bei 37°C und 200 rpm im Inkubatorschüttler wurden sie auf Selektivmedium ausgestrichen.

#### 2.3.1.7.1 Kompetente Zellen nach der CaCl-Methode

Eine Möglichkeit kompetente Zellen zu erzeugen ist die CaCl-Methode. Sie ist zwar in der Durchführung sehr einfach, führt jedoch nicht zu effizient transformierbaren Zellen. Von daher wurden die Zellen, die mit dieser Methode kompetent gemacht wurden, nur für die Transformation von bereits fertigen Konstrukten zum Beispiel für die Proteinexpression genutzt.

Von einer Einzelkolonie der kompetent zu machenden Kultur wurde eine 3 ml LB-Kultur angeimpft und das Medium im Inkubatorschüttler über Nacht inkubiert. Am folgenden Morgen wurden 50 ml LB mit 2 ml der Übernachtskultur angeimpft und die Kultur bei 37°C, 250 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 geschüttelt und die Zellen durch Zentrifugation (1000 g; 4°C; 10 min) geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml eiskaltem CaCl<sub>2</sub>-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden erneut wie oben zentrifugiert und anschließend in 2 ml CaCl<sub>2</sub>-Puffer resuspendiert. Die Zellen können nun aliquotiert und sofort transformiert oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert werden.

#### 2.3.1.7.2 Kompetente Zellen nach der RbCl-Methode

Kompetente Zellen die effizienter zu Transformieren sind, erhält man mit der RbCl<sub>2</sub>-Methode. Sie können auch für die Transformation von Ligationen eingesetzt werden.

Von einer Einzelkolonie wurde eine 3 ml LB-Kultur angeimpft und diese über Nacht im Inkubatorschüttler inkubiert. Aus der Übernachtskultur wurden 50 ml LB im Verhältnis 1:100 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4300 g; 4°C; 8 min) geerntet und in 8 ml Puffer Rf1 resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut wie oben pelletiert und in Puffer Rf2 aufgenommen, 30 min auf Eis inkubiert, in Aliquotes von 200 µl geteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

**Lösung**

<b>CaCl<sub>2</sub>-Puffer</b>	Tris/HCl pH 7,0;	25 mM
	NaCl	10 mM
	CaCl <sub>2</sub>	50 mM
<b>Puffer Rf1</b>	RbCl <sub>2</sub>	100 mM
	MnCl <sub>2</sub>	50 mM
	Kaliumacetat	30 mM
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM
	Glycerin	15 % (w/v)
	Ameisensäure	bis pH 5,8
<b>Puffer Rf2</b>	MOPS/KOH, pH 6,8	10 mM
	RbCl <sub>2</sub>	10 mM
	CaCl <sub>2</sub>	75 mM
	Glycerin	15 % (w/v)

**Tabelle 2.9 Lösungen für das Kompetentmachen von *E. coli*****2.3.1.8 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli***

Zur Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* wurden die entsprechenden Plasmide in den Expressionsstamm transformiert (s. Kap. 2.3.1.7). Aus der resultierenden Flüssigkultur wurde die Vorkultur angeimpft. Diese wurden über Nacht unter Expressionsbedingungen dicht geschüttelt und am nächsten Morgen mit ihr die Expressionskultur angeimpft. Die Expression selber wurde dann bei einer definierten Zelldichte mit IPTG induziert. Nach der Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation mit 6.000 g für 20 min geerntet und mit 4 ml Waschpuffer pro ml Zellen gewaschen. Um beim pQE Expressionssystem das Repressorplasmid pREP4 nicht cotransformieren zu müssen, wurden die Expressionsstämme mit diesem transformiert und die das Repressorplasmid tragenden Zellen anschließend mit der CaCl-Methode, zur Transformation mit dem Zielvektor kompetent gemacht.

Lösung		
<b>IPTG Stammlösung<sup>1</sup></b>	IPTG	1 M
<b>1000x Antibiotikalösung<sup>1</sup></b>	Ampicillin	100 mg/ml
	Kanamycin	25 mg/ml
<b>Waschpuffer</b>	Tris/HCl pH 7,5	50 mM
	NaCl	300 mM

**Tabelle 2.10 Lösungen für die Expression von rekombinantem Protein in *E. coli***

<sup>1</sup> die Lösungen wurden steril filtriert und bei -20°C gelagert.

## 2.3.2 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur *in vitro* Synthese von DNA mithilfe der DNA-Polymerase. Hierbei ersetzen dNTP Oligonukleotide den bei der Replikation für den Polymerisationsstart nötigen RNA-Primer. Diese flankieren die zu amplifizierende DNA-Region. Der 5'Primer (Forward) wird komplementär zum (+)Strang und der 3'Primer (Reverse) komplementär zum (-)Strang der Zielsequenz gewählt. Um ein Hybridisieren der Primer mit der doppelsträngigen Template-DNA zu ermöglichen, wird diese durch Kochen denaturiert und die Probe dann auf eine Temperatur abgekühlt, bei der die Primer spezifisch mit dem Template hybridisieren können. Nun kann die Polymerase den einzelnen Strang verdoppeln. Beginnt man nun einen weiteren Reaktionszyklus mit einer Denaturierung, stehen der Polymerase nach dem erneuten Hybridisieren sowohl die als Template zugegebene DNA als auch die Produkte der letzten Elongation als Template zur Verfügung. Dieses führt zu einer exponentiellen Zunahme des Produktes.

Es ist auch möglich die Primer an ihren 5'Enden zu verlängern, und so dem Produkt Nukleotide hinzuzufügen. Dies wurde in dieser Arbeit genutzt, um die Sequenzen um Restriktionsstellen zu ergänzen.

### 2.3.2.1 PCR zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen

Wurde die PCR zur Analyse genutzt, wurde in aller Regel Taq-Polymerase eingesetzt. Bei Amplifikationen für Klonierungen wurde wegen ihrer Proof Reading Funktion Vent-Polymerase eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Schema pipettiert:

Polymerase		
<b>Taq-Polymerase<sup>1</sup></b>	10x Taq-Puffer	2 µl
	dNTPs (10 mM jew.)	0,5 µl
	Primer F 10 µM	1 µl
	Primer R 10 µM	1 µl
	Taq-Polymerase	1 U
	DNA-Template	~1-50 ng
	H <sub>2</sub> O <sup>2</sup>	bis 20 µl
<b>Vent-Polymerase<sup>3</sup></b>	10x Vent-Puffer	5 µl
	MgSO <sub>4</sub> 100 mM	1 µl
	dNTPs (10 mM jew.)	1 µl
	Primer F (10 µM)	0,5 µl
	Primer R (10 µM)	0,5 µl
	Vent-Polymerase	1 U
	DNA-Template	~1-50 ng
	H <sub>2</sub> O <sup>2</sup>	bis 50 µl

**Tabelle 2.11 Pipettierschemata für die PCR**

<sup>1</sup> von Eppendorf (Hamburg); <sup>2</sup> autoklaviert; <sup>3</sup> von New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)

Für die Reaktionen wurde folgendes Temperaturprogramm genutzt:

	Temperatur	Zeit	
Hotstart	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	30 s	
Hybridisierung	s.u.	30 s	32 Zyklen
Synthese	72°C	s.u.	
Endelongation	72°C	10 min	
Reaktionsende	4°C	∞	

**Tabelle 2.12 Temperaturprogramm für die PCR**

Die Hybridisierungstemperatur wurde in Abhängigkeit von den verwendeten Primern gewählt. Die Synthesezeit orientiert sich an der Produktlänge, Taq-Polymerase synthetisiert etwa 1 kbp min<sup>-1</sup>, Vent-Polymerase etwa 0,5 kbp min<sup>-1</sup>.

#### 2.3.2.1.1 *E. coli* Ganz-Zell-PCR

Bei der Ganz-Zell-PCR wurde mit einer sterilen Pipettenspitze ein Teil einer *E. coli* Kolonie aus einer Plattenkultur im Reaktionsansatz suspendiert. Durch einen Hotstart von 10 min wurden die Zellen aufgeschlossen und die so freigesetzte DNA konnte als Template dienen.

#### 2.3.2.1.2 A-Addition

Da Vent-Polymerasen, anders als Taq-Polymerasen, keine A-Überhänge erzeugen, können ihre PCR-Produkte nicht in den, mit T-Überhängen ausgestatteten, pGEM-T Vektor kloniert werden. Zur Generierung der erforderlichen A-Überhänge wird mithilfe der Taq-Polymerase dATP an die Produktenden addiert. Der Reaktionsansatz wurde dann für 15 min bei 72°C im PCR-Cycler inkubiert.

Komponente	Volumen
PCR Produkt <sup>1</sup>	s. u.
10x Taq-Puffer	2 µl
Taq-Polymerase	1 U
dATP 10 µM	0,1 µl
H <sub>2</sub> O <sup>2</sup>	bis 20 µl

**Tabelle 2.13 Pipettierschema für die A-Addition**

<sup>1</sup> Das PCR-Produkt wird zuvor über ein Agarosegel gereinigt und möglichst vollständig eingesetzt; <sup>2</sup> autoklaviert

#### 2.3.2.2 Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR kann zur Bestimmung der relativen Menge eines spezifischen Transkripts in Bezug zu einem internen Standard genutzt werden. Hierfür wurde zuerst RNA aus der Probe isoliert, enzymatisch von DNA befreit und die Gesamtheit der prozessierten



mRNA mittels eines dT Hexanukleotid Primers revers zu cDNA transkribiert. Aus der cDNA wurde nun durch spezifische Primer das zu untersuchende Transkript und der interne Standard amplifiziert. Durch die Nutzung eines speziellen Realtime PCR Cyclers war es möglich, die Akkumulation des PCR Produktes im Verlauf des PCR Programms zu verfolgen. Dieser nutzt, dass SYBR Green mit doppelsträngiger DNA einen fluoreszierenden Farbstoffkomplex bildet. Am Ende jeder Synthesephase eines PCR Zyklus misst der Cycler die Fluoreszenz des dsDNA SYBR Green Farbstoffkomplexes und somit die Zunahme des PCR Produktes. Den so ermittelten Kurven konnte nun der Ct-Wert entnommen werden. Er entspricht der Zyklenzahl, an der die Probe einen Schwellenwert überschreitet. Dieser kann willkürlich innerhalb des exponentiellen Bereiches der Kurven gewählt werden muss aber für die Probe und ihren entsprechenden Standard gleich sein. Nimmt man nun eine Verdoppelung des PCR Produktes pro Zyklus an, ergibt sich die relative Expression aus:

$$Expression_{rel.} = \frac{2^{Ct-Wert_S}}{2^{Ct-Wert_P}}$$

#### Formel 2.2

Wobei  $Expression_{rel.}$ , relative Expression;  $Ct-Wert_S$ , Ct-Wert des internen Standards;  $Ct-Wert_P$ , Ct-Wert der Probe

Da in dieser Arbeit nur ein einzelnes Proben-Transkript mit dem Standard verglichen wurde, ist die Annahme einer PCR-Effizienz von 2 hinreichend und ihre Bestimmung zur Korrektur der Messung nicht notwendig.

#### 2.3.2.2.1 RNA Isolation und cDNA Synthese

Die Vorbereitung der cDNA wurde mit der Isolation von RNA mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) aus *Arabidopsis* Rosettenblättern begonnen. Hierfür wurden 100 mg frisches Blattmaterial mit 50 µl RLT Puffer, mit 1% (v/v) 2-Mercaptoethanol komplementiert, in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit flüssigem Stickstoff gefroren und nach der Zugabe von 2 Stahlkugeln mit 5 mm Durchmesser in einer Schwingbechermühle dreimal für 30 s bei 30 Hz zu einem feinen Pulver vermahlen. Um ein Auftauen der Probe zu verhindern, wurde die Probe zwischen den einzelnen Mahlgängen erneut in flüssigem Stickstoff gefroren. Das resultierende Pulver wurde nun in 400 µl Puffer RLT, mit 1% (v/v) 2-Mercaptoethanol komplementiert, aufgenommen und in eine QIAshredder Säule überführt. Diese wurde für 2 min bei 20.000 g zentrifugiert und der Durchbruch der Säule in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Diesem wurden 0,5 Volumen Ethanol DAB zugegeben, gemischt und auf eine RNeasy Mini Säule überführt. Die Säule wurde für 15 s bei 10.600 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die an die Säule gebundene RNA wurde dann einmal mit 700 µl Puffer RW1 und zweimal mit je 700 µl Puffer RPE gewaschen und dazwischen wie oben zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 20.000 g trocken zentrifugiert. Die RNA konnte nun mit 30 µl RNase freiem Wasser eluiert werden, wobei es empfehlenswert ist, die Elution ein zweites mal nach der ersten Elution mit dem vorhandenen Eluat zu wiederholen. Die RNA wurde nun absorptionspektroskopisch quantifiziert, wobei folgende Formel zur Konzentrationsbestimmung genutzt wurde.

$$A_{260} \cdot 40 = c_{RNA} \left[ \frac{ng}{\mu l} \right]$$

#### Formel 2.3

Wobei  $A_{260}$ , Absorption der Probe bei 260 nm;  $c_{RNA}$ , Konzentration der RNA in  $ng \mu l^{-1}$

Vor der cDNA Synthese wurde nun die eventuell noch vorhandene DNA in der Probe enzymatisch verdaut und das Enzym anschließend inaktiviert. Hierzu wurde das Turbo DNA-free Kit von Ambion (Austin, TX, USA) verwendet. Für den Verdau wurden 2,5 µg RNA mit RNase freiem Wasser auf 22 µl verdünnt und 2,5 µl 10x DNase Puffer und 0,5 µl DNase zugesetzt. Der Verdau erfolgte für 25 min bei 37°C. Anschließend wurde der Probe 2,5 µl Inaktivierungsreagenz zugegeben und bei gelegentlichem Mischen bei Raumtemperatur für 2 min inkubiert. Anschließend wurde das Inaktivierungsreagenz durch Zentrifugation bei 10.600 g für 2 min pelletiert und vom Überstand zwei 11 µl Aliquotes entnommen die bei -80°C gelagert wurden.

Zur Reversen-Transkription wurden die 11 µl RNA Aliquotes mit 1,5 µl RT Master Mix 1 komplementiert und zur Hybridisierung mit dem dT Hexanukleotid im PCR-Cycler für 5 min bei 65°C inkubiert. Die Probe wurde nun auf Eis abgekühlt und 6,5 µl RT Master Mix 2 zugegeben. Vor der Zugabe von 0,7 µl Reversen-Transcriptase (SuperScript II reverse transcriptase; Invitrogen, Paisley, UK) wurde die Probe auf 37°C gebracht und dann für 50 min bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde das Enzym für 15 min bei 70°C inaktiviert und die Probe bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Master Mix		Pipettierschema	
RT Master Mix 1	dT Hexanukleotid 100 µM <sup>2</sup>	2,5 µM	0,5 µM
	dNTPs (10 mM jew.) <sup>2</sup>	0,5 mM	1 µl
RT Master Mix 2	5x First Strand Puffer <sup>1</sup>	1x	4 µl
	DTT 0,1 M <sup>1</sup>	10 mM	2 µl
	RiboLock RNase Inhibitor 40 U/µl <sup>2</sup>	20 U	0,5 µl

**Tabelle 2.14 Master Mix für die Reverse Transkription**

<sup>1</sup> Invitrogen (Paisley, UK); <sup>2</sup> Fermentas (Vilnius, Litauen)

#### 2.3.2.2.2 Realtime PCR

Zur Quantifizierung der Transkripte und des internen Standards wurden 23 µl des Realtime PCR Master Mix 1 µl der cDNA zugegeben und das Reaktionsgefäß mit einer für die Fluoreszenzmessung geeigneten Klebefolie verschlossen. Das PCR-Programm kann der Tabelle 2.15 entnommen werden, wobei der Hotstart hier zwingend zu Aktivierung der Polymerase notwendig ist. Im Anschluss der Reaktion wurde zusätzlich eine Schmelzkurve des Produktes in 0,2°C Schritten durch einen linearen Temperaturgradienten von 60-95°C aufgenommen, um die unspezifische Synthese von PCR Produkten während der Reaktion auszuschließen. Die Steuerung des Cyclers sowie die Ermittlung der Ct-Werte als auch die Darstellung der Schmelzkurven wurden mit dem Programm Realplex 1.5 (Eppendorf, Hamburg) vorgenommen.

Komponente	Volumen
10x Absolute QPCR Mix <sup>1</sup>	2,5 µl
Forward Primer 10 µM	1 µl
Reverse Primer 10 µM	1 µl
H <sub>2</sub> O	18,5 µl

**Tabelle 2.15 Pipettierschema für den Realtime PCR Master Mix**<sup>1</sup> ABgene Thermo Scientific, Epsom, UK

	Temperatur	Zeit	
Hotstart	95°C	15 min	
Denaturierung	95°C	20 s	
Hybridisierung	60°C	35 s	40 Zyklen
Synthese	72°C	30 s	
Schmelzkurve	95°C	15 s	
	60°C	15 s	
	60-95°C	20 min	
	95°C	15 s	

**Tabelle 2.16 Temperaturprogramm für die Realtime PCR**

Die Messungen der Fluoreszenz erfolgte jeweils am Ende der Synthese Phase und für die Schmelzkurve in 0,2°C Schritten;

### 2.3.3 Transformation von *Arabidopsis thaliana* Protoplasten

Die Transformation von *Arabidopsis* Protoplasten erfolgte, mit einigen Modifikationen, nach dem Protokoll von Negrutiu *et. al.* (1987). Hierbei wurden zuerst die Zellen protoplastiert und dann durch osmotischen Schock mit dem Plasmid transformiert.

10 ml der zu transformierenden Zellen wurden drei Tage nach dem Passieren in frisches Medium bei 400 g bei RT für 5 min pelletiert und mit 10 ml enzymfreiem Protoplastierungspuffer gewaschen. Das resultierende Pellet wurde in 7 ml Protoplastierungspuffer aufgenommen und die Zellsuspension in eine Petrischale überführt. Zur Protoplastierung wurden die Zellen nun für 6 h bei 22°C und 50 rpm im Inkubatorschüttler inkubiert. Die Resultierenden Protoplasten wurden mit 100 g bei RT für 5 min pelletiert und mit 10 ml enzymfreiem Protoplastierungspuffer gewaschen. Die Zellen wurden nun vorsichtig in 5 ml enzymfreien Protoplastierungspuffer aufgenommen und langsam 10 ml W5 Lösung zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden erneut wie oben zentrifugiert und das Pellet in 10 ml W5 Lösung aufgenommen. Sie wurden dann, für 20 min im Dunkeln inkubiert, und währenddessen die Zellzahl mit der Thomakammer

bestimmt. Anschließend wurden die Zellen erneut wie oben zentrifugiert, die W5 Lösung vollständig entnommen und die Zellen mit MMM Lösung auf eine Zellzahl von  $2 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$  verdünnt. Pro Transformation wurden nun 250  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension in ein frisches Gefäß überführt und 20  $\mu\text{g}$  Plasmid DNA zugegeben. Nun wurden 250  $\mu\text{l}$  PEG Lösung zugegeben, vorsichtig gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Über einen Zeitraum von mindestens 2 min wurden nun vorsichtig 10 ml W5 Lösung zugetropft. Die Zellen wurden nun wie oben pelletiert und in 2 ml  $\text{K}_3$  Lösung aufgenommen und für 20 h im Dunklen bei  $22^\circ\text{C}$  inkubiert.

### Lösung

<b>Protoplastierungspuffer<sup>1</sup></b>	Cellulase	1% (w/v)
	Macerozym	0,25% (w/v)
	$\text{CaCl}_2$	8 mM
	Mannitol	0,4 M
	HCl	bis pH 5,5
<b>W5 Lösung<sup>2</sup></b>	NaCl	154 mM
	$\text{CaCl}_2$	125 mM
	KCl	5 mM
	Glucose	5 mM
	HCl	bis pH 5,8-6,0
<b>MMM Lösung<sup>2</sup></b>	$\text{MgCl}_2$	15 mM
	MES	0,1% (w/v)
	Mannitol	0,5 M
	KOH	bis pH 5,8
<b>PEG Lösung<sup>2</sup></b>	PEG 4000	40% (w/v)
	Mannitol	0,4 M
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,1 M
	KOH	bis pH 8-9

<b>K<sub>3</sub> Medium</b>	Saccharose	400 mM
	MS Salze	1x
	Xylose	250 mg/l
	CaCl	460 mg/l
	Myo-Inositol	100 mg/l
	Thiamin	10 mg/l
	Pyridoxin	1 mg/l
	Nikotinsäure	1 mg/l

**Tabelle 2.17 Lösungen für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* Protoplasten**

<sup>1</sup> steril filtriert; <sup>2</sup> autoklaviert;

### 2.3.4 Isolation von Gesamt-DNA aus *Arabidopsis thaliana* Blättern

Zur Isolation von Gesamt-DNA aus *Arabidopsis* Blättern wurden drei mittelgroße Rosettenblätter (~300 mg) in flüssigem Stickstoff gefroren und in ein mit flüssigem Stickstoff gekühltes 2 ml Reaktionsgefäß überführt, welches zwei Stahlkugeln mit 5 mm Durchmesser enthielt. Die erneut gekühlte Probe wurde dann drei Mal für 30 s bei 30 Hz in einer Schwingbechermühle zu einem feinen Pulver vermahlen. Zwischen den einzelnen Mahlgängen wurde die Probe erneut gekühlt. Dem vermahlenen Pflanzenmaterial wurden nun 600 µl CTAB Puffer zugegeben und die Probe für 30 min bei 65°C und gelegentlichem Schütteln inkubiert. 550 µl Lysat wurden dem Reaktionsgefäß entnommen und zwei Mal mit einem Teil Chloroform:Isoamylalkohol (24:1 v/v) extrahiert. Zur Verbesserung der Phasentrennung wurde mit 20.000 g bei RT für 30 min zentrifugiert. Die im wässrigen Überstand gelöste DNA wurde dann mit einem Teil Isopropanol gefällt und mit 20.000 g bei 4°C für 15 min pelletiert. Das DNA-Pellet wurde dann mit 1000 µl 70% Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 20 µl EB gelöst.

#### Lösung

<b>CTAB Puffer</b>	Tris/HCl pH 8,0	20 mM
	EDTA	20 mM
	NaCl	1,4 M
	CTAB	2% (w/v)
	Polyvinylpyrrolidon	1% (w/v)
<b>EB</b>	Tris/HCl pH 8,0	10 mM

**Tabelle 2.18 Lösungen für die Isolation von gesamt DNA aus *Arabidopsis thaliana* Blättern**

## 2.3.5 Southern Blot

Der Southern Blot (Southern, 1975) ermöglicht die Detektion von spezifischen DNA Sequenzen und die Bestimmung der Größe des DNA-Stranges, in dem sie enthalten ist. Hierzu werden die in der Probe enthaltenden DNA Stränge elektrophoretisch getrennt, denaturiert und auf eine DNA bindende Membran geblottet. Nun wird die DNA mit einer markierten Sonde der zu detektierenden Sequenz hybridisiert und anschließend die Sonde detektiert.

### 2.3.5.1 Herstellung einer DIG-markierten DNA Sonde

Zur Herstellung der DIG markierten Sonde wurde die zu markierende Sequenz mittels PCR mit den Primern HPT F und HPT R aus dem Vektor pPCV812 35S::At-*PHR1* amplifiziert. Das PCR-Programm bestand aus einem Hotstart bei 95°C für 5 min, 32 Zyklen von je 30 s Denaturierung bei 95°C, 30 s Primer Hybridisierung bei 62°C und 60 s Elongation bei 72°C und einer Endelongation von 10 min bei 72°C. Das Produkt wurde über ein Agarosegel (Kap. 2.3.1.5) aufgereinigt und die Produkte von zwei Reaktionen in 15 µl EB aufgenommen. Diese wurden für 10 min bei 95°C im PCR-Cycler denaturiert und ein Renaturieren durch schnelles Abkühlen in Eiswasser verhindert. Der Probe wurden aus dem DIG DNA Labeling Kit (Roche, Basel, Schweiz) nun 2 µl Hexanukleotid Mix, 2 µl dNTP Labeling Mix und 1 µl Klenow Enzym zugegeben und für 20 h bei 37°C im PCR-Cycler inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0.2 M EDTA, pH 8,0 gestoppt und die Sonde bei 4°C gelagert.

### 2.3.5.2 DNA-Transfer auf Membranen

Die benötigten DNA-Proben wurden aus Rosettenblättern extrahiert und das DNA-Pellet nach dem Trocknen in 20 µl EB aufgenommen (s. Kap. 2.3.4). Diesem wurde 1 µl RNase Lösung zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Den Proben wurden nun 50 µl Ethanol zugegeben und die DNA für 30 min auf Eis gefällt, bei 20.000 g und 4°C für 20 min pelletiert, getrocknet und in 15 µl EB aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde absorptionsspektroskopisch bestimmt und 20 µg DNA entweder mit 80 U NcoI oder PstI über Nacht bei 37°C verdaut. Die so generierten DNA Fragmente wurden auf einem 21 cm langen und 14,5 cm breiten, 0,7% Agarosegel (s. Kap. 2.3.1.5) getrennt und das Gel anschließend auf etwa 17x13 cm zurechtgeschnitten. Um den Transfer von DNA Fragmenten über 5 kbp zu gewährleisten, wurde das Gel für 14 min bei RT in 0,125 M HCl depuriniert und das Gel anschließend mit bidest. Wasser gewaschen. Die DNA wurde nun für 30 min in Denaturierungspuffer denaturiert, mit bidest. Wasser gewaschen und das Gel für 30 min mit Neutralisierungspuffer neutralisiert und mit bidest. Wasser gewaschen. Zur Vorbereitung zum Kapillarblot wurde das Gel in 20x SSC äquilibriert und die DNA mit 20x SSC über Nacht auf eine Hybond N+ (GE Healthcare, Freiburg) Membran transferiert. Diese wurde mit 2x SSC gewaschen und für 30 min an der Luft getrocknet. Zur Fixierung der DNA auf der Membran wurde diese für 2 h bei 80°C gebacken. Die fertige Membran wurde nun zwischen zwei Whatman Papieren in einen Plastikbeutel eingeschweißt bei 4°C gelagert.

### 2.3.5.3 Hybridisierung und Detektion der Sonde

Zur Hybridisierung der Sonde wurde die Membran bei der Hybridisierungstemperatur von 62°C für 40 min in 15 ml Roti-Hybri-Quick (Roth, Karlsruhe) Hybridisierungslösung vorhybridisiert. Nun wurde der Hybridisierungslösung die wie oben synthetisierte Sonde zugegeben und über Nacht hybridisiert. Am nächsten Morgen wurde die Sonde vorsichtig von der Membran abgegossen und zur Wiederverwendung bei 4°C gelagert. Um

überschüssige oder unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen, wurde die Membran zwei Mal bei 62°C mit 2x SSC, 0,1% SDS (w/v) für 5 min gewaschen und dieses mit 0,5x SSC, 0,1% SDS (w/v) wiederholt. Für die Detektion der Sonde mit CPD-Star (Roche, Basel, Schweiz) wurde die Membran dann für 5 min mit Waschpuffer gewaschen und für 30 min mit 100 ml Blockpuffer geblockt. Der Blockpuffer wurde verworfen und die Membran für 30 min in 60 ml Antikörperlösung ( $\alpha$  DIG::AP 1:20.000 in Blockpuffer) geschwenkt. Überschüssiger Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen für 15 min mit je 100 ml Waschpuffer entfernt und die Membran mit Detektionspuffer äquilibriert. Nun wurde die Membran in einen Plastikbeutel gelegt, CPD-Star 1:100 in Detektionspuffer zugegeben, bis die Membran bedeckt war und der Beutel verschweißt. Die Alkalische Phosphatase abhängige Chemolumineszenz wurde dann mit einem orthochromatischen Photofilm (GE Healthcare, München) detektiert.

### Lösung

<b>RNase Lösung<sup>1</sup></b>	RNase A	0,01 µg/µl
	Tris/HCl pH 7,5	10 mM
	NaCl	15 mM
<b>Denaturierungspuffer</b>	NaOH	0,5 M
	NaCl	1,5 M
<b>Neutralisierungspuffer</b>	Tris/HCl pH 7,5	0,5 M
	NaCl	1,5 M
<b>1x SSC</b>	Trinatriumcitrat	15 mM
	NaCl	150 mM
<b>Waschpuffer</b>	Malat/NaOH, pH 7,5	100 mM
	NaOH	150 mM
	Tween 20	0,3% (v/v)
<b>Blockpuffer</b>	Malat/NaOH, pH 7,5	100 mM
	NaOH	150 mM
	Tween 20	0,3% (v/v)
	Block Reagenz	1% (w/v)

<b>Detektionspuffer</b>	Tris/HCl, pH 9,5	100 mM
	NaCl	100 mM

**Tabelle 2.19 Lösungen für den Southern Blot**

<sup>1</sup> Die RNase Lösung wurde durch dreimaliges kochen bei 95°C für 15 min von DNase Aktivität befreit.

## 2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.4.1 Grundtechniken

#### 2.4.1.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen in dieser Arbeit wurden mit dem Bio-Rad Protein Test (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) oder der Amidoschwarz Proteinbestimmung durchgeführt. Wegen der deutlich einfacheren Durchführung, der besseren Sensitivität und größeren Genauigkeit wurde, wann immer möglich, der Bio-Rad Protein Test verwendet.

##### 2.4.1.1.1 Bio-Rad Protein Test

Der Bio-Rad Protein Test ist ein verbesserter Bradford Assay (Bradford, 1976). Er basiert auf der Bindung des nicht protonierten blauen Coomassie Brilliant Blau Anions an die Aminosäuren Arginin, Tryptophan, Tyrosin und Histidin aus einer sauren Lösung des roten Coomassie Kations. Hierdurch verfärbt sich die Lösung in Abhängigkeit von der vorhandenen Proteinmenge von rot nach blau. Die Bindung basiert hauptsächlich auf Van der Waals Kräften und die Aminosäuren müssen hierfür als Teil eines Polymers vorliegen (Compton & Jones, 1985). Auch wenn der Bradford Assay bis heute als schnell, sensitiv und spezifisch gilt, müssen einige Einschränkungen des Tests beachtet werden. (i) Die Bindung des Farbstoffes an das Protein basiert auf nur vier Aminosäuren, von denen nur Arginin eine hohe Affinität zum Coomassie Anion hat. Es können, vor allem im Bezug auf den Arginingehalt der Proteine, die Messungen zwischen unterschiedlichen Proteinen recht unterschiedlich ausfallen. (ii) Detergenzien können die hydrophoben Bereiche des Farbstoffes maskieren, sodass die neutrale grüne Farbstoffspezies entsteht, die aufgrund der überlappenden Absorptionsspektren mit der Messung des blauen Anions interferiert. (iii) Stark basische Proben können den pH-Wert der Lösung derart anheben, dass hierdurch bereits das zu messende Anion entsteht. (iv) Blaue Farbstoffe stören den Test, da sie während der Durchführung nicht entfernt werden und auch sie mit der Messung des blauen Anions interferieren.

Für die Durchführung wurde die von BioRad (Hercules, CA, USA) vertriebene Testlösung im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. Hiervon wurden je 1000 µl in eine Einmalküvette pipettiert und bis zu 15 µl Probenlösung zugegeben. Die Küvette wurde mit Parafilm abgedeckt und der Inhalt durch mehrfaches Invertieren gründlich gemischt. Nach fünf Minuten Inkubation bleibt die Färbung für mindestens zwanzig Minuten stabil. In dieser Zeit wurde die Absorption bei 595 nm gegen eine probenfreie Referenzküvette mit Testlösung gemessen. Anhand einer Eichgeraden die mit 0 bis 10 µg BSA erstellt wurde, kann die Absorption in die Proteinmenge umgerechnet werden. Die verdünnte Testlösung ist bei 4°C und lichtgeschützt gelagert bis zu fünf Wochen haltbar.



#### 2.4.1.1.2 Amidoschwarz Proteinbestimmung

Die Amidoschwarz Proteinbestimmung beruht auf der Fällung der Proteine als Farbstoffkomplex aus saurer methanolischer Farbstofflösung. Die gefärbten und präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation pelletiert und mit Waschlösung von ungebundenem Farbstoff befreit. Anschließend wurde das gewaschene Pellet in NaOH aufgenommen und die der Proteinmenge proportionale Farbstoffmenge mit dem Absorptionsspektrometer bestimmt (Schaffner & Weissmann, 1973; Popov *et al.*, 1975). Da die Proteine für die Quantifizierung gefällt werden, ist der Amidoschwarz Test sehr unempfindlich gegenüber Beeinträchtigungen durch in der Probe enthaltene Stoffe. Farbstoffe und Detergenzien in der Probe stören den Test nicht, solange diese in der Färbelösung löslich bleiben, den Farbstoff nicht binden oder sich nicht mit der gemessenen Absorption des Amidoschwarz überlappen. Durch den hohen Säuregehalt der Färbelösung hat auch der pH-Wert der Probe keinen Einfluss auf das Ergebnis. Die schlechtere Nachweisgrenze, die aufwendige Durchführung mit vielen Arbeitsschritten und die daraus resultierende hohe Variabilität der Messergebnisse sind jedoch im Vergleich zum Bradford Test ein deutlicher Nachteil, sodass der Amidoschwarztest nur Anwendung fand, wenn aufgrund von Interferenzen mit Probenkomponenten der Bradford Test nicht infrage kam. Dies gilt vor allem für Proteinbestimmungen in SDS-Probenpuffer.

Für die Amidoschwarz Proteinbestimmung wurde die Probe mit Aqua dest. auf 200 µl verdünnt, mit 800 µl Färbelösung versetzt und durch Invertieren gründlich gemischt. Die ausgefallenen Proteine wurden bei 20.000 g für 12 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde nun mit 1000 µl Waschlösung versetzt, gründlich gerüttelt und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Die Waschlösung wurde verworfen und das Pellet für 10 min getrocknet. Der Protein-Farbstoff-Komplex wurde in 0,2 M NaOH aufgenommen und die Absorption bei 615 nm gegen eine Leerprobe bestimmt. Zur Umrechnung der  $A_{615}$  in die Proteinmenge wurde eine Eichgerade von 0 bis 25 µg Rinderserumalbumin erstellt.

##### Lösung

<b>Färbelösung</b>	Methanol	90 % (v/v)
	Eisessig	10 % (v/v)
	Amidoschwarz 10B	bis $OD_{615}=10$
<b>Waschlösung</b>	Methanol	90 % (v/v)
	Eisessig	10 % (v/v)

**Tabelle 2.20 Lösungen für die Amidoschwarz Proteinbestimmung**

Beide Lösungen können bei RT gelagert werden. Die Färbelösung muss nach dem Ansetzen durch einen Faltenfilter von nicht gelösten Farbstoffpartikeln befreit werden.

#### 2.4.1.2 Proteinextraktion aus *A. thaliana*

Zur Extraktion von löslichem Gesamtprotein, wurden 80-120 mg frisches Blattmaterial in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einem Pistill in 200 µl eiskaltem Extraktionspuffer zerrieben. Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (20.000 g; 5 min; 4°C) abgetrennt und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

**Extraktionspuffer**

NaP <sub>i</sub> Puffer, pH 7,4	50 mM
NaCl	500 mM
Glycerin	20 % (v/v)
Complete Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free <sup>1</sup>	1 Tablette / 10 ml

**Tabelle 2.21 Extraktionspuffer für die Proteinextraktion aus *A. thaliana*.**<sup>1</sup> (Roche, Basel, Schweiz)**2.4.1.3 Elektrophoretische Trennung von Proteinen**

Elektrophorese ist ein hochauflösendes analytisches und präparatives Verfahren. Sie nutzt die unterschiedliche Mobilität der Probenbestandteile im elektrischen Feld zu ihrer Trennung. Die Mobilität der Teilchen ist hierbei von mehreren Faktoren abhängig. Die beschleunigende Kraft ist abhängig von der Stärke des angelegten elektrischen Feldes und der Ladung der Teilchen. Ihr entgegen wirkt die Reibung, abhängig von der molaren Masse, der Wanderungsgeschwindigkeit und gegebenenfalls von der Porengröße des Gelmediums, als auch die Retardations- und Relaxationskräfte die von der Ladung, der räumlichen Struktur und der molaren Masse abhängig sind. Die aus diesen vier Kräften resultierende effektive Mobilität ist die stoffspezifische Eigenschaft nach der bei der Elektrophorese getrennt wird (Lottspeich & Zorbas, 1998).

Um die Eigenladung der Proteine während der Elektrophorese zu überdecken, wurden die Seitenketten der Aminosäuren bei der Probenvorbereitung mit SDS assoziiert. Die Überlagerung der Eigenladung ist effizient und reproduzierbar genug um eine Abhängigkeit zwischen der Länge der Primärsequenz und der Ladung herzustellen. Auch wird die Faltung der Proteine vollkommen geöffnet und durch Reduktionsmittel zusätzlich Disulfidbrücken gespalten, sodass die effektive Mobilität während der Trennung direkt von der Ladung und der Länge der mit SDS assoziierten Aminosäurekette und somit indirekt von ihrer molaren Masse abhängt.

Zur Verbesserung der Bandenschärfe wurden diskontinuierliche Gele verwendet. Bei diesen wurde direkt auf das Trenngel ein Sammelgel mit geringer Acrylamid Konzentration und pH-Wert 6,8 gegossen. Der pH-Wert im Sammelgel liegt so nahe am Isoelektrischen Punkt des Glycins (IP Glycin 5,97 (Hardy, 1985)), dass dieses eine geringere Mobilität im Sammelgel als die Proteine der Probe hat und diese als Folgeion vor sich herschiebt. Stoßen die hochmolekularen Proteine nun auf das engporige Trenngel, werden sie hier so stark verlangsamt, dass es zu einem Stau und in seiner Folge zu einem Zusammenschieben der Proteine zu einer schmalen Bande kommt. Das niedermolekulare Glycin ist hiervon nicht betroffen und kann, durch den höheren pH-Wert im Trenngel, der seine Nettoladung und somit seine Mobilität erhöht, die Proteine direkt an der Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel überholen. Nun wurden die so eng fokussierten Proteine normal elektrophoretisch getrennt.

Während dieser Arbeit wurde vor allem Lämmli-Gele verwendet. Da Schägger-Gele jedoch bei kleineren Proteinen unter 25 kDa eine deutlich bessere Trennung bei einer geringeren Acrylamidkonzentration im Trenngel erlauben, wurden diese hierfür verwendet.

### 2.4.1.3.1 Probenvorbereitung

Komplexe Proben wie Lysate zum Beispiel wurden mit Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C inkubiert und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 20.000 g und RT für 10 min pelletiert. Einfache Proben wie Eluate wurden mit Probenpuffer versetzt und für 15 min bei RT inkubiert und kurz zentrifugiert. Die Proben wurden sofort auf dem Gel getrennt oder bei –20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die eingefrorenen Proben jedoch kurz auf etwa 50°C erhitzt, um das überschüssige SDS wieder in Lösung zu bringen.

### 2.4.1.3.2 SDS-Page nach Lämmli

Für die SDS-Page nach Lämmli (Lämmli, 1970) wurden die Proben wie oben beschrieben vorbereitet und das Gel nach unten stehendem Pipettierschema zwischen zwei Mini Protean III (BioRad, Hercules, CA, USA) Glasplatten mit einer Gelstärke von 0,75 mm gegossen. Das Trenngel wurde nach dem Gießen vorsichtig mit Isopropanol : Wasser 1:1 überschichtet um eine waagerechte, blasenfreie Oberkante zu erhalten und um den die Polymerisation inhibierenden Luftsauerstoff vom Gel zu trennen. War das Trenngel auspolymerisiert, wurde die Isopropanol : Wasser Mischung entfernt, das Sammelgel gegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Das fertig geladene Gel wurde dann mit Lämmli Laufpuffer an Anode und Kathode bei konstantem Strom von 25 mA mit einer maximalen Leistungsaufnahme von 7,5 W entwickelt.

<b>Gel</b>			
<b>Trenngel 10 %</b>	Acrylamid-Stammlösung		5 ml
	Tris/HCl pH 8,8	1,5 M	2,5 ml
	H <sub>2</sub> O		2,5 ml
	SDS	10 % (w/v)	100 µl
	APS	10 % (w/v)	40 µl
	TEMED		6 µl
<b>Sammelgel 4 %</b>	Acrylamid-Stammlösung		1,25 ml
	Tris/HCl pH 6,8	0,5 M	1,25 ml
	H <sub>2</sub> O		2,45 ml
	SDS	10 % (w/v)	100 µl
	APS	10 % (w/v)	37,5 µl
	TEMED		2,5 µl

**Tabelle 2.22 Pipettierschema für Lämmli Gele**  
Pipettierschema für 2 Lämmli Minigele

### 2.4.1.3.3 SDS-Page nach Schägger

Die SDS-Page nach Schägger (Schägger & von Jagow, 1987) wurde wie die SDS-Page nach Lämmli durchgeführt, nur dass das untenstehende Pipettierschema verwendet wurde und die Schägger Laufpuffer genutzt wurden.

Gel			
<b>Trenngel 6 %</b>	Acrylamid-Stammlösung		3,03 ml
	Tris/HCl, pH 8,45	3 M	3,077 ml
	Glycerin	50% (v/v)	2,125 ml
	H <sub>2</sub> O		1,742 ml
	10% SDS	10 % (w/v)	101 µl
	APS	10 % (w/v)	45,8 µl
	TEMED		11,4 µl
<b>Sammelgel 3,5 %</b>	Acrylamid-Stammlösung		890 µl
	Tris/HCl, pH 8,45	3 M	924 µl
	Glycerin	50% (v/v)	-
	H <sub>2</sub> O		3,174 ml
	10% SDS	10 % (w/v)	27,68 µl
	APS	10 % (w/v)	59,14 µl
	TEMED		14,79 µl

**Tabelle 2.23 Pipettierschema für Schggergele**

Pipettierschema für 2 Schägger Minigele

### 2.4.1.3.4 Färben und Entfärben von Proteingelen

Um die im Gel getrennten Proteine sichtbar zu machen, wurden die fertigen Gele über Nacht in Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel mit 10 % (v/v) Essigsäure entfärbt. Die in der Färbelösung enthaltenen Säuren und Lösungsmittel präzipitierten die Proteine zudem, sodass die Proteine im Gel fixiert wurden. Um Färbung oder Entfärbung zu beschleunigen, wurden die Gele in der entsprechenden Lösung in der Mikrowelle auf ca. 70°C erwärmt.

#### 2.4.1.3.5 Aufbewahren und Archivieren von SDS-Gelen

Fertig gefärbte Gele konnten für einige Tage in Entfärber gelagert werden. Zur Archivierung wurde der Entfärber mit Wasser ausgewaschen und die Gele luftblasenfrei zwischen zwei feuchten Cellophanfolien in einen Rahmen gespannt und getrocknet.

<b>Lösung</b>		
<b>Probenpuffer<sup>1</sup></b>	Tris/HCl (pH 6,8)	225 mM
	Glycerin	50 % (v/v)
	SDS	5 % (w/v)
	Bromphenol Blau	0,05 % (w/v)
	DTT	250 mM
<b>Acrylamid-Stammlösung</b>	Acrylamid	20 % (w/v)
	Bisacrylamid	0,53 % (w/v)
<b>Lämmli Laufpuffer</b>	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
<b>Schägger Anodenpuffer</b>	Tris/HCl (pH 8,9)	0,2 M
<b>Schägger Kathodenpuffer</b>	Tris	0,1 M
	Tricin 1M	0,1 M
	SDS	0,1 % (w/v)
<b>Färbelösung</b>	Isopropanol	25 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	R250 Coomassie	0,05 % (w/v)

**Tabelle 2.24 Lösungen für die SDS-PAGE**

<sup>1</sup> Der Probenpuffer wurde aliquotiert, bei -20°C gelagert und vor gebrauch kurz erwärmt, um das SDS wieder zu lösen.

#### 2.4.1.4 Western Blot Analyse

Bei der Western Blot Analyse wird eine elektrophoretisch getrennte Proteinprobe auf eine Membran transferiert, um einzelne Proteinbestandteile immunologisch nachzuweisen. Hierfür wird die Probe einer elektrophoretischen Trennung unterzogen und die Proteine mittels Elektroblothing auf eine Protein bindende Membran transferiert. Die noch freien Bindekapazitäten der Membran werden nun saturiert und die Membran mit einem für das Zielprotein spezifischen Primärantikörper inkubiert. Dieser wird mit einem Primärantikörper-

spezifischen, enzymgelabelten Sekundärantikörper detektiert, indem die enzymabhängige Chemolumineszenz mit einem Röntgenfilm nachgewiesen wird. Der Nachweis mittels Sekundärantikörper hat den Vorteil, dass sie die Sensitivität verbessert und er eine aufwendige Modifikation des wertvollen Primärantikörpers unnötig macht.

Für die Western Blot Analyse wurde die zu analysierende Probe wie oben beschrieben (s. Kap. 2.4.1.3) elektrophoretisch getrennt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Gelplatten frei von Fett- und Proteinverunreinigungen waren. Das fertige Gel wurde dann vorsichtig der Gelkammer entnommen und in Bjerrum, Schäfer-Nilsen Transferpuffer (Bjerrum & Schäfer-Nilsen, 1986) äquilibriert. Währenddessen wurden sechs Lagen Whatman 3MM Papier (Macherey & Nagel, Düren) mit Transferpuffer getränkt und auf der Anode der Transblot-Apparatur aufgeschichtet. Auf das Whatman Papier wurde die erst mit Methanol aktivierte und dann in Transferpuffer geschwenkte PVDF Membran (Macherey & Nagel, Düren) aufgelegt. Dieser folgten das Gel und sechs weitere Lagen mit Transferpuffer getränktem Whatman Papier. Beim Aufbau des Blotting Sandwiches war darauf zu achten, keine Luftblasen einzuschließen, da diese Diskontinuitäten im elektrischen Feld während des Transfers zu Folge hätten. Anschließend wurde für eine Stunde bei 21 V und einer maximalen Leistungsaufnahme von 42 W geblottet.

Die fertig geblottete Membran wurde nach dem Transfer für eine Stunde unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank über Nacht in Blockpuffer saturiert. Der Blockpuffer wurde dreimal mit reichlich TBS-T für 10 min unter ständigem Schütteln gewaschen und der Primärantikörper verdünnt in TBS-T oder Blockpuffer hinzugegeben. Es wurde für eine Stunde bei RT unter ständigem Schütteln inkubiert und nachfolgend wie oben beschrieben gewaschen. Der HRP gekoppelte Sekundärantikörper wurde nun 1:10.000 in TBS-T verdünnt zugegeben und wieder für eine Stunde bei RT unter ständigem Schütteln inkubiert. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde dann wie oben beschrieben gewaschen.

Zur Detektion der HRP-Aktivität wurde die Membran mit Waschpuffer umgepuffert, mit Detektionslösung benetzt und luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt. Die HRP abhängige Chemolumineszenz konnte dann mit einem orthochromatischen Photofilm (GE Healthcare, München) detektiert werden. Der Film wurde anschließend entwickelt, fixiert und bei Bedarf gescannt.

#### 2.4.1.4.1 Stripping von Western Blot Membranen

Sollte eine bereits analysierte Membran mit einem weiteren Primärantikörper untersucht werden, mussten zuerst die noch von der vorherigen Analyse an der Membran haftenden Antikörper entfernt werden. Hierfür wurde die Membran für 30 min bei 60°C in reichlich Stripping-Puffer geschwenkt. Nachdem die Membran erneut geblockt worden war, konnte ein neuer Primärantikörper zugegeben werden.

Lösung		
<b>Transferpuffer</b>	Tris	48 mM
	Glycin	39 mM
	SDS	0,0375% (w/v)
	Methanol	20% (v/v)
<b>TBS-T<sup>1</sup></b>	Tris/HCl, pH 7,5	20 mM
	NaCl	150 mM
	Tween-20	0,1% (v/v)
<b>Blockpuffer<sup>1</sup></b>	BSA <sup>2</sup> oder	3% (w/v) in TBS-T
	Milchpulver	7% (w/v) in TBS-T
<b>Waschpuffer</b>	Tris/HCl, pH 7,5	0,5 M
<b>Detektionslösung<sup>3</sup></b>	Luminol	2,5 mM
	p-Cumarsäure	0,4 mM
	Tris/HCl, pH 8,5	100 mM
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9,15·10 <sup>-3</sup> %
<b>Stripping Puffer</b>	Tris/HCl, pH 6,7	65,6 mM
	2-Mercaptoethanol	100 mM
	SDS	2% (w/v)

**Tabelle 2.25 Lösungen für die Western Blot Analyse**

<sup>1</sup> Zur dauerhaften Lagerung von Antikörpern wurde die Lösung mit 0,02% (w/v) Natriumazid komplementiert;

<sup>2</sup> Die fertige Lösung wurde steril filtriert, <sup>3</sup> das Luminol wurde in DMSO vorgelöst und das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erst direkt vor Gebrauch zugegeben.

#### 2.4.1.5 Ultrafiltration

Bei der Ultrafiltration werden Makromoleküle von kleineren Teilchen getrennt und aufkonzentriert. Die Probe wird auf einen Membranfilter gegeben, der die Makromoleküle zurückhält, während kleinere Teilchen und das Lösungsmittel den Filter passieren können und als Permeat dem zurückbleibenden Retentat entzogen werden. Hierdurch werden die Makromoleküle im Retentat aufkonzentriert und können auch durch wiederholtes Zugabe eines Zielpuffers zum Retentat in diesen umgepuffert werden. Die Porengröße der Membran wird als Molecular Weight Cut Off (MCWO) in Dalton angegeben und gibt die minimale Molekülmasse eines globulären Teilchens an, dass von der Membran zurückgehalten wird. Durch die sehr kleinen Poren ist es nötig, den Transmembranfluss durch eine mechanische Erhöhung des Transmembrandrucks zu verbessern.

Der MWCO wurde immer mindestens 20 % kleiner als das Zielprotein gewählt und der nötige Transmembrandruck durch Zentrifugation hergestellt. Da die in dieser Arbeit verwendeten Filter Dead-End-Technik verwenden, war es, um eine zu hohe Aufkonzentration des Proteins an der Membran zu vermeiden, notwendig, die Filtration regelmäßig zu unterbrechen, um das Retentat zu durchmischen.

## **2.4.2 Proteinreinigung**

### **2.4.2.1 Zellaufbruch**

Für den Zellaufbruch von *E. coli* Zellen wurden im Verlauf dieser Arbeit zwei verschiedene Methoden eingesetzt. Entweder wurde die Zellwand enzymatisch mit Lysozym durch die Spaltung der  $\beta$ -1,4-Glycosidischen Bindung des Peptidoglycans der bakteriellen Zellwand geschwächt (Blake *et al.*, 1965; Johnson & Phillips, 1965) und die Zellen dann mechanisch durch Ultraschall aufgebrochen oder die Zellen wurden rein mechanisch in der French-press aufgebrochen.

Die erste Methode hat den Vorteil, dass, wenn im Ultraschallbad aufgebrochen wird, mehrere Proben parallel prozessiert werden können, ohne Kreuzkontaminationen befürchten zu müssen. Sie hat jedoch den Nachteil, dass nur sehr kleine Mengen an Zellen pro Probe aufgebrochen werden können und, dass sich die Zusammensetzung des Aufbruchpuffers nicht nur nach dem Zielprotein der Reinigung, sondern auch nach den enzymatischen Eigenschaften des Lysozyms richten muss. In der French-press hingegen können in der 40 ml Zelle bis zu 10 ml Zellen aufgebrochen werden. Da der Aufschluss rein mechanisch erfolgt, kann der Aufbruchpuffer ganz an das Zielprotein angepasst werden. Die French-press hat den Nachteil, dass nur recht große Mengen an Zellen aufgeschlossen werden können und dass die French-press Zelle zwischen verschiedenen Aufbrüchen aufwendig gereinigt werden muss.

#### **2.4.2.1.1 Enzymatisch Mechanischer Aufbruch**

Für den enzymatisch mechanischen Aufbruch wurden die Zellen in eiskalten Lysepuffer aufgenommen, dem Hühnerei Lysozym zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugegeben wurde. Die Suspension wurde dann auf Eis für eine halbe Stunde geschüttelt und die Zellen anschließend für 15 min im Ultraschallbad aufgebrochen.

#### **2.4.2.1.2 Mechanischer Aufbruch**

Für den mechanischen Aufbruch wurden die Zellen in Aufbruchpuffer aufgenommen und gründlich homogenisiert, wobei das Volumen der Zellen maximal ein Viertel des Gesamtvolumens erreichen darf. Dann wurden die Zellen in drei Zyklen mit je 1500 psi aufgebrochen. Nach jedem Zyklus wurde die Probe durch Invertieren vorsichtig gemischt. Hierbei kann auch die Viskosität des Aufbruchs beurteilt werden. Durch die beim Aufbruch freigesetzten Nukleinsäuren wird die Probe nach dem ersten Aufbruchzyklus viskoser, bis sie dann durch das Scheren der langen Moleküle bei den folgenden Zyklen wieder an Viskosität verliert. War die Viskosität nach dem dritten Zyklus zu hoch, wurde ein weiterer Zyklus angeschlossen. Die Zelle für den Aufbruch wurde mindestens 16 h vor dem Aufbruch im Kühlraum auf 4°C abgekühlt. Die schwere Stahlzelle war dann durch ihre hohe Wärmekapazität für mindestens eine Stunde kalt.



#### 2.4.2.1.3 Klären des Lysats

In beiden Fällen wurde das Lysat durch Zentrifugation in der Ultrazentrifuge mit dem Rotor TFT 70.38 bei 4°C und 50.000 rpm (190.000 g) für 40 min von Zellbruchstücken und unlöslichen Bestandteilen befreit und der Überstand anschließend durch einen 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter filtriert.

#### 2.4.2.2 Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatografie

Bei der Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatografie (IMAC) nutzt man die Affinität von Proteinen zu Metallionen, die an der Chromatografiematrix immobilisiert wurden zu deren Trennung. Bei der Affinität zu den Metallionen kann es sich um eine endogene Eigenschaft der Proteine handeln oder um eine Eigenschaft, die durch einen Tag rekombinant hinzugefügt wurde. Zielproteine zur Aufreinigung wurden im Rahmen dieser Arbeit mit einem 6xHis Tag fusioniert. Im deprotonierten Zustand können die Imidazolringe des Histidins einen stabilen Komplex mit dem immobilisierten Metallion bilden und somit das Protein an die Matrix binden. Da die Bindung auf den chemischen Eigenschaften des Histidins beruht, ist sie unabhängig von der Konformation des Proteins. Dies erlaubt es, auch unter denaturierenden Bedingungen zu reinigen. Das Zielprotein kann dann durch Zugabe von Imidazol von der Matrix eluiert werden, da dieses, im Überschuss zugegeben, die Histidine des His Tags von den Metallionen verdrängt.

Für die IMAC wurden die Zellen in At-PHR1 His A Puffer wie oben beschrieben aufgebrochen und das Lysat geklärt. Das so vorbereitete Lysat wurde mit der Ladepumpe der ÄKTA direkt auf die mit At-PHR1 His A Puffer äquilibrierte 5 ml HisTrap Säule (GE Healthcare, München) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetragen. Ungebundenes Protein wurde anschließend mit 5 CV Puffer At-PHR1 His A bei 1 ml/min von der Säule gewaschen, unspezifisch Gebundenes mit 5 CV mit 5% Puffer At-PHR1 His B bei gleicher Flussrate. Das Zielprotein wurde dann mit 5 CV 60% Puffer At-PHR1 His B bei 1 ml/min von der Säule eluiert. Anschließend wurde die Säule für 1 CV mit 100% Puffer At-PHR1 His B gereinigt und wieder auf den Ausgangspuffer äquilibriert. Da At-PHR1 das Imidazol in Puffer At-PHR1 His B schlecht verträgt, wurde es durch Auffangen in Puffer At-PHR1 EPR oder At-PHR1 IEx A im Verhältnis 5:1 noch während der Fraktionierung verdünnt.

#### 2.4.2.3 Ionenaustausch Chromatografie

Ionenaustausch Chromatografie nutzt an die stationäre Phase gebundene geladene funktionelle Gruppen, um Gegenionen aus der Probe reversibel an die Matrix zu binden. Die gebundenen Probenbestandteile können dann durch Erhöhung der Ionenstärke des Laufmittels oder durch Änderung des pH-Wertes eluiert werden. Da der pH-Wert des Laufmittelgemisches die Ladung der zu trennenden Proteine stark beeinflusst, ist hier auf besonders sorgfältiges Arbeiten zu achten.

Die Probe, für die Ionenaustausch Chromatografie wurde durch Umpuffern in At-PHR1 IEx A oder durch Verdünnen mit diesem Puffer im Verhältnis 5:1 vorbereitet und mit der Ladepumpe des ÄKTA Purifiers auf die Säule aufgetragen. Die Mono S HR 10/10 (GE Healthcare, München) wurde vorher mit Puffer At-PHR1 IEx A äquilibriert und die ungebundenen Proteine mit 2 CV At-PHR1 IEx A von der Säule gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden nun mit einem linearen Gradienten von 0-100% Puffer At-PHR1 IEx B über 20 CV eluiert. Anschließend wurde die Säule mit 8 CV At-PHR1 IEx B gewaschen und wieder mit 5 CV auf Puffer At-PHR1 IEx A reäquilibriert.

#### 2.4.2.4 Gelfiltration

Bei der Gelfiltration wird eine poröse stationäre Phase verwendet, um die Probenbestandteile nach ihrem hydrodynamischen Volumen zu trennen. Kleinere Moleküle können sich während der Trennung im gesamten Raum, der nicht von der Matrix eingenommen wird, durch Diffusion bewegen. Zunehmend größeren Molekülen steht nur noch ein Teil dieses Volumens zu Verfügung, da sie aufgrund ihrer Größe von den kleineren Poren ausgeschlossen sind. In einem kontinuierlichen Laufmittelfluss eluieren die größeren Moleküle also früher, da ihnen nur ein kleineres Volumen für ihre Bewegung in der Säule zur Verfügung steht. Die lineare Flussgeschwindigkeit spielt für die Trennung, die auf Diffusion in die Poren beruht, eine entscheidende Rolle. Ist die Flussgeschwindigkeit zu hoch, haben die kleineren Teilchen nicht genügend Zeit horizontal zur Flussrichtung in die Poren zu diffundieren. Ist sie zu niedrig, diffundieren die größeren Teilchen zu sehr in Flussrichtung auseinander und ihre Peaks verschmieren. Dieses kann auch dazu verwendet werden eine Trennung zu optimieren. Durch eine höhere Flussrate wird eine bessere Auflösung bei großen, durch eine niedrigere eine bessere bei den kleineren Teilchen erreicht. Da die zu trennenden Probenbestandteile bei der Gelfiltration nicht von der stationären Phase gebunden werden, ist eine große Trennhöhe der Säule erforderlich. Auch ist das trennbare Probenvolumen hierdurch stark eingeschränkt. Die Höhe der Probe in der Säule sollte 5% der Trennhöhe nicht überschreiten. Eine Ausnahme hierzu stellt das Umpuffern von Proteinen durch Gelfiltration dar. Da der Größenunterschied zwischen den Pufferkomponenten und den Proteinen sehr groß ist, können hier die Säulen mit deutlich mehr Probe beladen werden.

##### 2.4.2.4.1 Gelfiltration zur Proteinreinigung

Die Probe für die Gelfiltration wurde durch Ultrafiltration so weit wie möglich, mindestens aber auf ein Volumen von 1 ml eingeengt und über eine Probenschleife auf die am ÄKTA-Purifier angeschlossene Säule aufgetragen. Bei einer konstanten Flussrate von 0,5 ml/min wurde der 64 cm hoch mit 130 ml Superdex 200 Prep Grade gefüllte XK 16/70 Säulenkörper (beide GE Healthcare, München) mit 1,5 CV Puffer At-PHR1 GF entwickelt. Alternativ wurde eine Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare, München) mit einer Flussrate von 0,25 ml/min verwendet.

##### 2.4.2.4.2 Gelfiltration zum Umpuffern

Zum Umpuffern wurden PD 10 Säulchen (GE Healthcare, München) benutzt. Die Probe wurde auf ein Volumen von 2,5 ml gebracht und auf die mit Zielpuffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Wenn die Probe vollständig in die Säule gelaufen war, wurden die Proteine durch Zugabe von weiteren 3,5 ml Zielpuffer von der Säule eluiert.

Puffer		
At-PHR1 His A	NaP <sub>i</sub> Puffer pH 7,4	50 mM
	NaCl	500 mM
	Glycerin	20% (v/v)

<b>At-PHR1 His B</b>	NaP <sub>i</sub> Puffer pH 7,4	50 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol <sup>1</sup>	250 mM
	Glycerin	20% (v/v)
<b>At-PHR1 EPR</b>	NaP <sub>i</sub> Puffer pH 7,0	50 mM
	NaCl	700 mM
	Glycerin	50% (v/v)
<b>At-PHR1 IEx A</b>	NaP <sub>i</sub> Puffer pH 7,0	50 mM
	NaCl	100 mM
	Glycerin	20% (v/v)
<b>At-PHR1 IEx B</b>	NaP <sub>i</sub> Puffer pH 7,0	50 mM
	NaCl	1 M
	Glycerin	20% (v/v)
<b>At-PHR1 GF</b>	Tris/HCl pH 7,5	10 mM
	NaCl	500 mM
	Glycerin	10% (v/v)
	NaN <sub>3</sub>	0,01% (w/v)

**Tabelle 2.26 Puffer für die Proteinreinigung**

Alle Puffer für die FPLC wurden durch einen 0,2 µm Filter von Partikeln befreit und entgast. <sup>1</sup> Es wurde Imidazol Puffersubstanz von Merk (Darmstadt #1.04716.) verwendet, der pH-Wert kann erst nach der Zugabe des Imidazols eingestellt werden.

#### 2.4.2.5 Antigen spezifische Affinitätschromatografie

Die Antigen spezifische Affinitätschromatografie wird genutzt, um aus polyklonalen Seren Antigen spezifische Proben zu reinigen. Hierzu wird das entsprechende Antigen kovalent an die stationäre Phase gebunden, um die antigenspezifischen Antikörper an sie zu binden. Unspezifische Antikörper können dann durch Waschen entfernt werden und die spezifischen anschließend von der Matrix eluiert werden.

Zuerst wurden 0,3 g (~1 ml gequollen) Cyanogen Bromid aktivierte Agarose (Sigma, Steinheim #C9210) nach den Angaben des Herstellers in kalter 0,1 M HCl für 30 min gequollen und anschließend in mehreren Durchgängen mit insgesamt 100 ml 0,1 M HCl gewaschen. Die Matrix wurde dann mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Kopplungspuffer äquilibriert. Von hier an folgt das Protokoll mit einigen Modifikationen Harlow und Lane (1999). Der in Kopplungspuffer aufgeschlammten Matrix wurde dann, zur

kovalenten Bindung des Antigens, 10 mg At-PHR1 in Kopplungspuffer zugegeben und das Volumen auf 10 ml gebracht. In einem Überkopfschüttler wurde die Suspension dann über Nacht im Kühlraum inkubiert und am nächsten Abend ungebundenes Protein mit Kopplungspuffer ausgewaschen. Der Matrix wurden nun 10 ml Blockpuffer zugegeben, um die Bindekapazität der Säule zu saturieren. Sie wurde wieder über Nacht im Überkopfschüttler bei 6°C inkubiert. Am folgenden Morgen wurde der Blockpuffer mit Bindepuffer ausgewaschen und die Matrix in eine Gravity Flow Säule (0,7 x 10 cm) überführt. Das an diesem Punkt von Harlow und Lane beschriebene Waschen unter Elutionsbedingungen wurde übersprungen, da die extremen pH-Werte zur Denaturierung des Proteins geführt hätten. Statt dessen wurde ausgiebig mit 20 CV Bindepuffer gewaschen. Das zu reinigende polyklonale Serum wurde mit neun Teilen Bindepuffer verdünnt und in drei Durchgängen mit niedriger Flussrate über die Matrix gegeben. Die Matrix wurde anschließend mit 20 CV Bindepuffer und dann mit 20 CV Kopplungspuffer gewaschen. Zur Elution von säuresensitiv gebundenen Antikörpern wurde mit 10 CV Elutionspuffer 1 eluiert und das Eluat in 1 CV 1 M Tris/HCl pH 8,0 aufgefangen. Die Säule wurde nun mit 10 mM Tris/HCl pH 8,8 gewaschen bis der pH-Wert des Eluats, dem des Puffers entsprach. Nun wurden die basensensitiv gebundenen Antikörper mit 10 CV Elutionspuffer 2 von der Säule eluiert und das Eluat in 1 CV 1 M Tris/HCl pH 8,0 aufgefangen. Die beide Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration auf PBS gebracht.

#### Lösung

<b>Kopplungspuffer<sup>1</sup></b>	NaP <sub>i</sub> Puffer pH 7,4	50 mM
	NaCl	500 mM
	Glycerin	20% (v/v)
<b>Blockpuffer</b>	NaP <sub>i</sub> Puffer pH 7,4	50 mM
	NaCl	500 mM
	Ethanolamin	100 mM
	Glycerin	20% (v/v)
<b>Bindepuffer</b>	NaP <sub>i</sub> Puffer pH 7,4	50 mM
	NaCl	100 mM
	Glycerin	20% (v/v)
<b>Elutionspuffer 1</b>	Glycin pH 2,5	100 mM
	Tris/HCl pH 8,0	1 M
	Tris/HCl pH 8,8	10 mM
<b>Elutionspuffer 2<sup>2</sup></b>	Triethylamin pH 11,5	100 mM

<b>PBS</b>	NaP <sub>i</sub> Puffer pH 7,4	10 mM
	NaCl	150 mM

**Tabelle 2.27 Lösungen für die Antigen spezifische Affinitätschromatografie**

<sup>1</sup> Entspricht At-PHR1 His A, <sup>2</sup> Die Triethylamin Lösung muss frisch angesetzt werden.

## 2.4.3 Analyse von proteingebundenen Flavin-Cofaktoren

### 2.4.3.1 Identifikation und Quantifizierung von Flavinen

Bei der Analyse der von Tt-PHR gebundenen Flavine FAD und FNM stellen sich folgende methodische Schwierigkeiten: (i) Beide Flavine sind durch ihre identischen Isoalloxazinringe absorptionsspektroskopisch nicht zu unterscheiden. (ii) Teile des FADs liegen proteingebunden als FADH<sup>o</sup> vor. Da es keine Referenzspektren von Tt-PHR gebundenem FAD oder FADH<sup>o</sup> gibt, können weder die Absorptionskoeffizienten der proteingebundenen Kofaktoren bestimmt, noch die Absorptionsspektren korrigiert werden. Die Flavine müssen also für die Analyse vom Protein gelöst, in einen einheitlichen Oxidationszustand gebracht und voneinander getrennt werden. (iii) Hierbei ergibt sich zusätzlich die Schwierigkeit, dass FAD, adenyliertes FMN, leicht an der Anhydridbindung des Diphosphates hydrolysiert wird und zu FMN und AMP zerfällt, was die Messergebnisse verfälschen würde. Um die Flavine möglichst schonend von dem Protein zu lösen, wurde dieses enzymatisch verdaut. Die verbleibenden Peptide wurden dann durch Chloroformextraktion von den Flavinen getrennt und diese über Reverse Phase Chromatografie getrennt. Die Identifikation und Quantifizierung erfolgte durch direkten Vergleich der Retentionszeiten und Peakflächen mit Standardflavinen.

Für den enzymatischen Verdau des Tt-PHR Proteins wurde es im Verhältnis 1:10 mit Pepsinlösung gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Lösung einmal mit Chloroform extrahiert und bei 20.000 g, 4°C für 10 min zentrifugiert. Die Flavine wurden mit der wässrigen Phase sofort in ein frisches Gefäß überführt. Die so gewonnene Probe kann nun im 500 µl Loop mit konstantem Fluss von 0,4 ml/min auf eine Nucleosil 100-10 C18 Säule (250x4 mm, Macherey-Nagel, Düren) aufgetragen werden. Die Trennung erfolgte nach dem Auswaschen des Durchbruches für 1,5 CV in einem linearen Gradienten von 10-60% Puffer B über 3,5 CV. Die Probenbestandteile wurden anschließend durch direkten Vergleich der Retentionszeiten und der Peakflächen identifiziert und quantifiziert. Die Flavinstandards wurden mit einer zur Tt-PHR äquivalenten Menge BSA komplettiert und wie oben beschrieben behandelt.

<b>Lösung</b>		
<b>Pepsinlösung</b>	Essigsäure/NaOH pH 4,0	10 mM
	Pepsin A <sup>1</sup>	1 mg/ml
<b>Puffer A</b>	Tris/HCl pH 8,0	10 mM
<b>Puffer B</b>	Methanol	

**Tabelle 2.28 Lösungen für die Identifikation und Quantifizierung von Flavinen**

<sup>1</sup> Pepsin A aus Schweinemagen Fluka/Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA #77160)

### 2.4.3.2 Analyse der Photoreduktion

Die Aufnahme oder Abgabe von Elektronen durch das chinoide System des Isoalloxazins hat großen Einfluss auf das konjugierte  $\pi$ -Elektronensystem von Flavinen. Die daraus resultierenden Änderungen der Absorptionseigenschaften kann man zur Analyse der unterschiedlichen Redox-Zustände nutzen.

Die lichtabhängige Reduktion der katalytischen FAD Kofaktoren von Photolyasen und Cryptochromen wurde charakterisiert, indem diese mit Licht bestrahlt wurden und dann, gegen eine Dunkelprobe, ein Absorptionsspektrum aufgenommen wurde. Das so durchgeführte direkte Messen von Differenzialspektren hat den Vorteil, dass alle eventuell vorhandenen lichtunabhängigen Absorptionsänderungen durch die Dunkelprobe korrigiert werden. Problematisch kann sich die Reoxidation des FAD durch den in dem Puffer gelösten Sauerstoff auswirken. Ist die Reoxidationsrate zu groß können nicht genug voll- oder teilreduzierte Flavinspezies akkumulieren, um diese nachweisen zu können. Um die Sauerstoffkonzentration im Puffer zu reduzieren, wurde die Probe in einer geschlossenen Küvette für 15 min mit Argon begast. War die Reduktion der Sauerstoffkonzentration auf diesem Weg nicht ausreichend, wurde der Sauerstoff quantitativ mittels Glukoseoxidase entfernt (s. Kap. 2.4.4.2).

## 2.4.4 Messung der Enzymaktivität von Photolyasen

### 2.4.4.1 Herstellen CPD-haltiger DNA als Substrat und Standard

Zur Herstellung CPD haltiger DNA wurde Salmon Sperm DNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in  $H_2O$  gelöst und wie in Tabelle 2.29 mit Aceton und  $AgNO_4$  komplementiert. Beide begünstigen während der Bestrahlung die Bildung von CPDs. Die fertige Lösung wurde in eine silanisierte Glaspetrischale ( $\varnothing$  10 cm) gegeben, mit einem 320 nm Kantenabsorptionsfilter abgedeckt und mit hochviskosem Silikonschliffett luftdicht verschlossen. Die Petrischale wurde nun mit einer Ultraviolett-B TL 40W/12 RS (Philips, Amstelveen, Niederlande) Leuchtstoffröhre aus einem Abstand von 30 cm für 12 h bei 4°C auf einer langsam laufenden Schüttelplatte bestrahlt. Im Anschluss wurde die CPD haltige DNA mit 0,1 Teilen 4 M NaCl und 1 Teil 2-Propanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in EB aufgenommen (s. Kap. 2.3.1.2).

#### Lösung

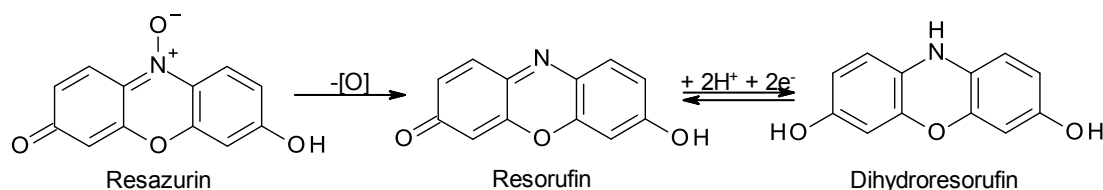
Lösung für die Bestrahlung	DNA	0,5 mg/ml
	$AgNO_4$	0,225 mM
	Aceton	25 % (v/v)
EB	Tris/HCl pH 8,0	10 mM

Tabelle 2.29 Lösungen zur Herstellung von CPD haltiger DNA

### 2.4.4.2 *In vitro* Enzymtest unter anaeroben Bedingungen

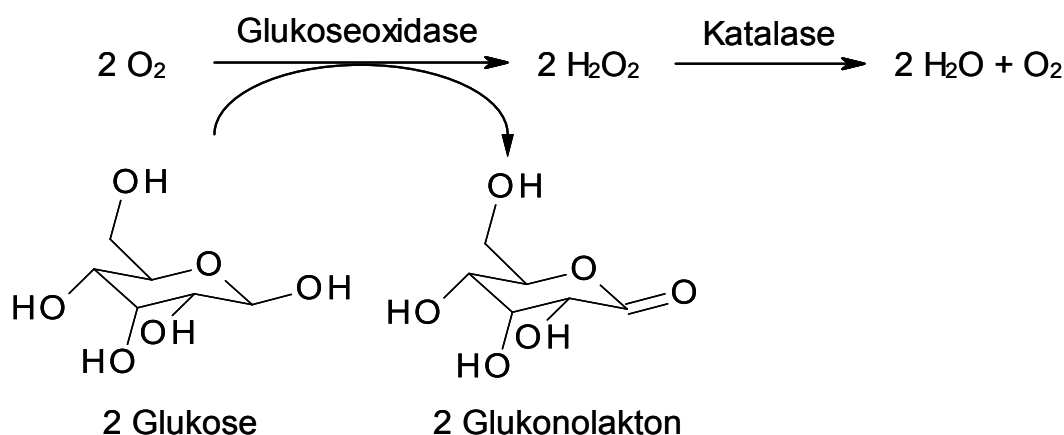
Zur Messung der Enzymaktivität von CPD Photolyasen *in vitro* unter anaeroben Bedingungen wurde zuerst der Reaktionspuffer mit 1 mg/ml Glukoseoxidase (GOD), 0,1 mg/ml Katalase und 10 mM Glukose komplementiert. Die Lösung wurde nun auf die Küvetten verteilt, eine

weitere Probe in ein Reaktionsgefäß überführt und die Lösungen mit Paraffinöl überschichtet um die Lösung vom Luftsauerstoff zu trennen. Der Probe im Reaktionsgefäß wurde 0,0002 % (w/v) Resazurin zugegeben, um die Umsetzung von Glukose und  $O_2$  zu Glukonolacton und Wasserstoffperoxid durch die GOD, beobachten zu können. Als redoxsensitiver Farbstoff zeigt er die quantitative Umsetzung des gelösten  $O_2$  an. Das blaue Resazurin wird zuerst durch die GOD-Aktivität irreversibel zum pinken Resorufin umgesetzt (Maeda *et al.*, 2001). Resorufin reagiert dann in Abhängigkeit des Redoxpotenzials reversibel zu dem farblosen Dihydroresorufin (Abbildung 2.1), sodass die Lösung ab einem Redoxpotenzial von etwa -80 mV farblos ist (Holdeman & Chen, 1977).



**Abbildung 2.1 Redoxübergänge des Resazurins**

Die der Lösung zugegebene Katalase verhindert eine für die Testkomponenten schädliche Akkumulation von  $H_2O_2$  (Abbildung 2.2). Die Proben wurden nun für 3 h bei RT inkubiert.



**Abbildung 2.2 Reaktionsschema für die Glukoseoxidase Katalase Reaktion**

Im Anschluss an die Anaerobisierung wurde den Küvetten unter rotem Sicherheitslicht, welches bis zum Ende des Tests aufrecht erhalten wurde, das Enzym zugegeben und dieses durch Weißlicht Bestrahlung mit einem Diaprojektor mit 320 nm Kantenabsorptionsfilter bei  $2500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  für 15 min photoaktiviert. Der Probe wurde nun CPD haltige DNA (s. Kap. 2.4.4.1) als Substrat zu einer Endkonzentration von 25 ng/ml zugegeben, mit einem Magnetstäbchen gründlich gemischt und 300  $\mu\text{l}$  als Dunkelprobe entnommen. Die Proben wurden nun unter kontinuierlichem Rühren entweder mit  $30,9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  UV-A aus einer L36W/73 Leuchtstoffröhre ( $\lambda_{\text{max}}$  370 nm) (Osram, München) oder mit  $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Blaulicht aus einem Diaprojektor mit einem 447 nm Interferenzfilter (Schott, Mainz) bestrahlt. Es wurden für 30 min in 4 min Intervallen 300  $\mu\text{l}$  Proben entnommen und in Reaktionsgefäße mit 300  $\mu\text{l}$  Phenol:Chloroform gegeben und sofort mit dem Rüttler das

Protein inaktiviert. Die Proben wurden von nun an nicht mehr im Sicherheitslicht gehalten. Zur Verbesserung der Phasentrennung wurde für 5 min bei 20.000 g zentrifugiert. Nach einer weiteren Extraktion mit Chloroform wurden viermal je 50 µl des wässrigen Überstands in die Vertiefungen einer ELISA-Platte (Microlon 96K, Greiner, Frickenhausen) pipettiert.

#### Lösung

Reaktionspuffer	NaP <sub>i</sub> Puffer pH 7,5	10 mM
	NaCl	150 mM
	DTT	10 mM

Tabelle 2.30 Lösungen für den *in vitro* Enzymtest von CPD Photolyasen

#### 2.4.4.3 Messung der CPD-Photolyase Reparaturaktivität *in planta*

Um die *in planta* Reparaturaktivität von CPD Photolyasen zu charakterisieren, wurde diese indirekt über die Akkumulationsrate von CPDs unter polychromatischen Lichtbedingungen gemessen. Das UV-B und UV-A reiche polychromatische Licht der Bestrahlung führt zum Einen zur Bildung von CPDs, erlaubt aber zum Anderen auch eine effektive Reparatur der erzeugten Schäden durch die Photolyase. Setzt man voraus, dass sowohl die Rate der CPD-Bildung als auch die Rate der Photolyase unabhängigen CPD-Reparatur bei allen untersuchten Pflanzen konstant ist, ist die CPD-Akkumulationsrate hier von der variierenden Reparaturaktivität der CPD-Photolyasen abhängig.

Die *Arabidopsis* Pflanzen für die Messung wurden für acht Wochen im Kurztag kultiviert (s. Kap. 2.2.2). Für die Bestrahlung wurden große Rosettenblätter auf 1/2 MS Platten gelegt und die Oberseiten der Blätter mit einem Leuchtfeld aus Philips (Eindhoven, Niederlande) TL40/W 12 Leuchtstoffröhren mit  $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bestrahlt. Mit null Minuten beginnend wurden nun jede 10 min eine Probe aus vier bis fünf Blättern genommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Aus den bestrahlten Blättern wurde Gesamt-DNA isoliert (s. Kap. 2.3.4), ihre Konzentration absorptionsspektroskopisch bestimmt (s. Kap. 2.3.1.3.1) und mit EB auf 15 ng/µl verdünnt. Je 50 µl dieser DNA-Lösung wurden nun in die Vertiefungen einer ELISA-Platte (Microlon 96K, Greiner, Frickenhausen) gegeben.

#### Lösung

½ MS Platten	MS Salze <sup>1</sup>	2,15 g/l
	Phytoagar <sup>1</sup>	1 % (w/v)
EB	Tris/HCl pH 8,0	10 mM

Tabelle 2.31 Lösungen für die Messung der CPD-Photolyase Reparaturaktivität *in planta*

<sup>1</sup> Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande

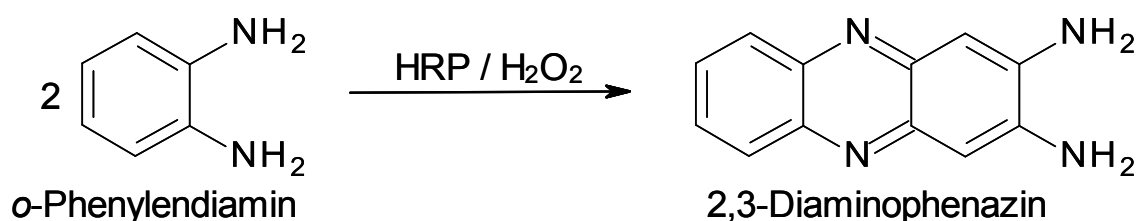
#### 2.4.4.4 Analyse des relativen CPD-Gehaltes von DNA durch ELISA

Der Enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (ELISA) ist ein schnelles, robustes und genaues immunologisches Nachweisverfahren. Die zu analysierende Probe wird hierbei am Boden



des Reaktionsgefäßes immobilisiert, um dann mit einem enzymgekoppelten Antikörpersystem spezifisch Probenbestandteile nachzuweisen. Da der ELISA keine weitere stoffspezifische Eigenschaft als die Antikörperbindung analysiert, ist die Spezifität der genutzten Antikörper von entscheidender Bedeutung für die Qualität des Tests.

In dieser Arbeit wurde ein sekundäres Antikörpersystem aus einem CPD spezifischen monoklonalen Primärantikörper und einem HRP konjugierten Sekundärantikörper genutzt. Die HRP-Aktivität konnte dann durch einen chromogenen Test nachgewiesen werden. Hierbei setzt die HRP das farblose *o*-Phenylendiamin (OPD) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  zum orange braunen 2,3-Diaminophenazin (DAP) und Wasser um (Abbildung 2.3) (Schall *et al.*, 1978; Tarcha *et al.*, 1987).



**Abbildung 2.3 HRP katalysierte Kopplung von *o*-Phenylendiamin**

HRP katalysierte Kopplung von *o*-Phenylendiamin zu 2,3-Diaminophenazin zum Nachweis der HRP-Aktivität beim ELISA aus (Tarcha *et al.*, 1987)

Um die DNA für die Analyse des relativen CPD Gehaltes an den Boden der ELISA-Platten zu binden, wurden die vorbereiteten DNA Lösungen in den Platten (s. Kap. 2.4.4.2 und 2.4.4.3), im Inkubatorschrank über Nacht bei 37°C eingetrocknet. Am nächsten Morgen wurden die Platten fünfmal mit reichlich PBS-T gewaschen und die noch verbleibende Bindekapazität der Platte mit 200 µl Blockpuffer für 1,5 h bei 37°C saturiert. Der Blockpuffer wurde durch fünfmaliges Waschen mit PBS-T aus der Platte gewaschen und diese vorsichtig auf einem Zellstoffstoß trocken geklopft. Zur Bindung der CPDs durch den primären Antikörper wurden je 50 µl in die Vertiefungen der Platte gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Der primäre Antikörper wurde nun durch fünfmaliges Waschen mit PBS-T entfernt und die Platte wiederum auf einem Zellstoffstoß vorsichtig trocken geklopft. Je 50 µl des HRP konjugierten sekundären Antikörpers wurden nun zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde zweimal mit PBS-T gewaschen und dann drei Mal auf Citrat Phosphatpuffer umgepuffert. Durch Zugabe von 100 µl OPD-Lösung wurde die HRP-Reaktion gestartet, eine ausreichende Färbung der Proben mit dem Auge abgeschätzt und die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gestoppt. Die Absorption der einzelnen Vertiefungen bei 490 nm wurde nun in einem ELISA Plate Reader (LambdaE, MWG-Biotech, Ebersberg) ausgelesen.

#### Lösung

PBS	NaP <sub>i</sub> Puffer pH 7,4	10 mM
	NaCl	150 mM

Blockpuffer	NaP <sub>i</sub> Puffer pH 7,4	10 mM
	NaCl	150 mM
	BSA	3 % (w/v)
PBS-T	NaP <sub>i</sub> Puffer pH 7,4	10 mM
	NaCl	150 mM
	Tween-20	0,05 % (v/v)
Primärer Antikörper	αCPD Antikörper <sup>1</sup>	1:1.000 (v/v)
	NaP <sub>i</sub> Puffer pH 7,4	10 mM
	NaCl	150 mM
Sekundärer Antikörper	αMouse::HRP <sup>2</sup>	1:2.000 (v/v)
	NaP <sub>i</sub> Puffer pH 7,4	10 mM
	NaCl	150 mM
Citrat Phosphat Puffer	Citrat/Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 5,0	24 mM
OPD Lösung	Citrat/Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 5,0	24 mM
	o-Phenylendiamin	0,4 % (w/v)
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,007 % (v/v)

**Tabelle 2.32 Lösungen für die Analyse des relativen CPD Gehaltes durch ELISA**

<sup>1</sup> clone KTM53 (Kamiya Biomedical Company Seattle, WA, USA); <sup>2</sup> Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA);

## 2.4.5 Proteinkristallisation

Für die Proteinkristallisation wurde das Protein in Puffer At-PHR1 GF auf die gewünschte Konzentration verdünnt oder durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Anschließend wurde es durch Filtration mit Filtern einer 0,2 µm Porengröße von Partikeln befreit. Für das Pipettieren der Kristallisationsansätze wurden 1000 µl Fällungsreagenz für die *Hanging Drop* Methode oder 60 µl für die *Sitting Drop* Methode im Reservoir der entsprechenden Platte vorgelegt. Nun wurde je 1 µl Proteinlösung auf dem Objektträger bzw. in die Tropfenbucht pipettiert und diese dann vorsichtig mit 1 µl des Fällungsreagenz aus dem Reservoir gemischt. Abschließend wurden die Platten luftdicht versiegelt.

Für die anaerobe Kristallisation im Anaerobenzelt wurden die Lösungen für drei Tage offen im Zelt unter leichtem Schütteln durch Diffusion anaerobisiert.

## 2.5 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Für die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie wurden die transformierten Protoplasten (s. Kap. 2.3.3) auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen mit

Vaselinefüßchen abgedeckt. Auf das Objekt wurde im Interferenzkontrast scharfgestellt und dann mittels Epifluoreszenz mit dem Filtersystem I3 geeignete Zellen gesucht. Diese wurden dann konfokal gescannt. Hierbei wurde ein Teilerspiegel mit einer Reflexionskante von 488 nm und eine Pinholeöffnung von 1 Airy genutzt. Die Photomultiplier Spannung wurde im linearen Bereich von 100-800 V gewählt und der Offset der Digitalisierung mit der Glow Over & Under Farbgebung so eingestellt, dass er die gesamte Signalbreite des Bildes erfasst.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen

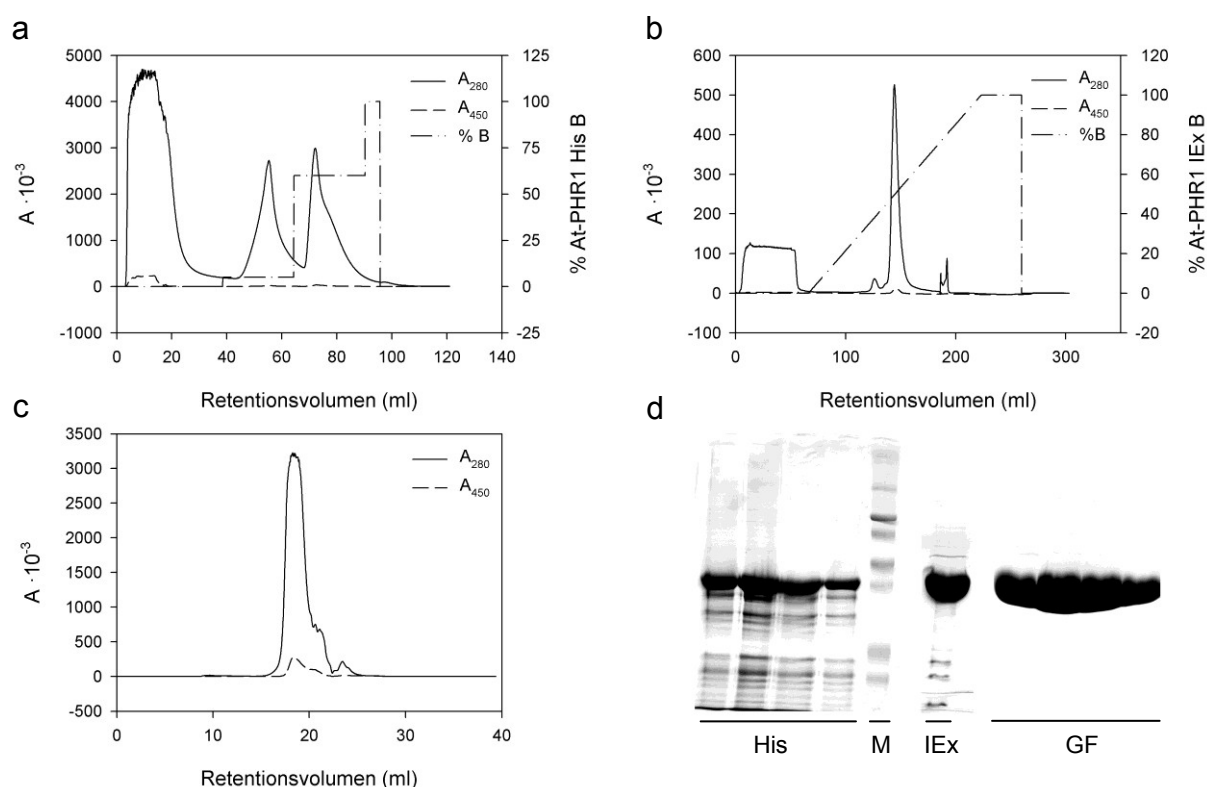
#### 3.1.1 Arabidopsis thaliana Photolyase

##### 3.1.1.1 Reinigung der At-PHR1

Zur Reinigung der At-PHR1 wurden CodonPlus BL21 Zellen, die das Repressorplasmid pREP4 trugen, mit pQE31 At-PHR1 transformiert und eine einzelne Kolonie am nächsten Morgen in 3 ml selektives LB überführt. Mit dieser Kultur wurde dann am Abend die Vorkultur in selektives TB-Medium inokuliert und über Nacht unter Expressionsbedingungen geschüttelt, bis eine dicht stationäre Kultur entstand. Am folgenden Morgen konnte dann die Expressionskultur im Verhältnis 1:11 angeimpft werden. Nun wurde das TB-Selektivmedium unter Expressionsbedingungen geschüttelt (250 rpm bei 30°C) und bei einer OD<sub>615</sub> von 0,8 die Expression mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert. Nach einer Expression von 4,5 h wurden die Zellen geerntet, gewaschen (Kap. 2.3.1.8) und bei -80°C gelagert.

Die Zellen wurden während des Auftauens in eiskaltem Puffer At-PHR1 His A aufgenommen und in der *Frech-press* lysiert. Das Lysat wurde geklärt (Kap. 2.4.2.1) und dann sofort mit der Ladepumpe des Äkta-Purifier Systems auf eine mit Nickel beladene 5 ml HisTrap-Säule aufgetragen. Nach dem Auswaschen des Säulendurchbruchs wurde unspezifisch gebundenes Protein entfernt. Das Zielprotein konnte dann von der Säule eluiert werden (Kap. 2.4.2.2) und wurde durch Auffangen in Puffer At-PHR1 IEx A sofort im Verhältnis 1:5 verdünnt. Die so gewonnenen photolyasehaltigen Fraktionen wurden dann auf eine MonoS HR 10/10 Säule aufgetragen, ungebundenes Protein ausgewaschen und At-PHR1 mit einem linearen Gradienten eluiert (Kap. 2.4.2.3). Die photolyasehaltigen Fraktionen wurden nun vereinigt und durch Ultrafiltration auf 1 ml eingengt. Es wurde nun sofort auf eine Superdex 200 HR Säule aufgetragen und die Säule entwickelt (Kap. 2.4.2.4). Die photolyasehaltigen Fraktionen wurden vereinigt und für die Kristallisation auf die gewünschte Konzentration gebracht. Alle Arbeitsschritte wurden im Kühlraum unter rotem Sicherheitslicht durchgeführt.

Abbildung 3.1 a, b und c zeigt die Chromatogramme der einzelnen Reinigungsschritte, Abbildung 3.1 d SDS-Polyacrylamidgele der einzelnen Eluate. Von der IMAC (Abbildung 3.1 a) eluiert das Protein mit einer Reinheit von etwa 70% (Abbildung 3.1 d, His). Durch die Ionenaustauschchromatographie (Abbildung 3.1 b) kann ein Großteil der Verunreinigungen entfernt werden, und die Reinheit des Proteins erhöht sich auf mindestens 95% (Abbildung 3.1 d, IEx). Während der Gelfiltration (Abbildung 3.1 c) können dann die wenigen noch verbleibenden kleineren Verunreinigungen vollständig abgetrennt werden (Abbildung 3.1 d, GF). Die Bande, die oberhalb der At-PHR1 läuft, verbleibt jedoch wenn auch sehr abgeschwächt. Nach der Gelfiltration betrug die Ausbeute an At-PHR1 zwischen 2,5 mg und 3 mg pro Liter Kultur.



**Abbildung 3.1 Chromatogramme und Gele der At-PHR1 Reinigung**

Für die Reinigung von rekombinanter At-PHR1 wurden die Zellen, die das Protein exprimiert hatten, in Puffer At-PHR1 His A aufgenommen und mechanisch aufgebrochen. Das Lysat wurde durch Zentrifugation von unlöslichen Bestandteilen befreit und durch einen Spritzenvorsatzfilter (4,5 µm Porengröße) filtriert. Das so geklärte Lysat wurde dann auf eine IMAC-Säule aufgetragen **a** und diese mit einem Imidazol-Gradienten entwickelt (Puffer At-PHR1 His B, rechte Ordinate). Die Elution der Proteine wurde dann durch ihre Absorption (linke Ordinate) bei 280 und 450 nm detektiert. Die Fraktionen der Elutionen bei 60% At-PHR1 His B wurden im Verhältnis 1:5 mit Puffer At-PHR1 IEx A verdünnt und auf einen Kationentauscher aufgetragen **b**. Dieser wurde dann mit einem Salzgradienten entwickelt (Puffer At-PHR1 IEx B, rechte Ordinate) und die Elution der Proteine durch ihre Absorption (linke Ordinate) bei 280 und 450 nm detektiert. Die At-PHR1-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration für die anschließende Gelfiltration eingeeengt und auf die Säule aufgetragen. Diese wurde dann mit Puffer At-PHR1 GF entwickelt **c** und die Proteine durch ihre Absorption bei 280 und 450 nm detektiert. **d** Lämmlichele der Aufreinigung, His Fraktionen des 60% At-PHR1 His B Peaks der IMAC, M SDS 7B Marker, IEx für die Gelfiltration aufkonzentrierte photolyasehaltige Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie, GF photolyasehaltige Fraktionen der Gelfiltration.

### 3.1.1.2 Kristallisation der At-PHR1

Die Kristallisationsexperimente wurden unter anaeroben Bedingungen bei 4°C unter gelbem Sicherheitslicht mit der Sitting Drop Methode durchgeführt. Auspipettiert wurden die Sigma Screens Basic, Extension und Cyro (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) mit je 50 verschiedenen Kristallisationsbedingungen und die Jena Screens 1-10 (Jena Bioscience, Jena) mit je 24 verschiedenen Kristallisationsbedingungen. Die Photolyase lag hierfür in Puffer At-PHR1 GF vor und wurde jeweils in der Konzentration von 12 und 7 mg/ml verwendet.

Unter keiner Bedingung der beiden auspipettierten Proteinkonzentrationen konnte die Bildung von Nadeln, Platten oder gar Kristallen beobachtet werden.

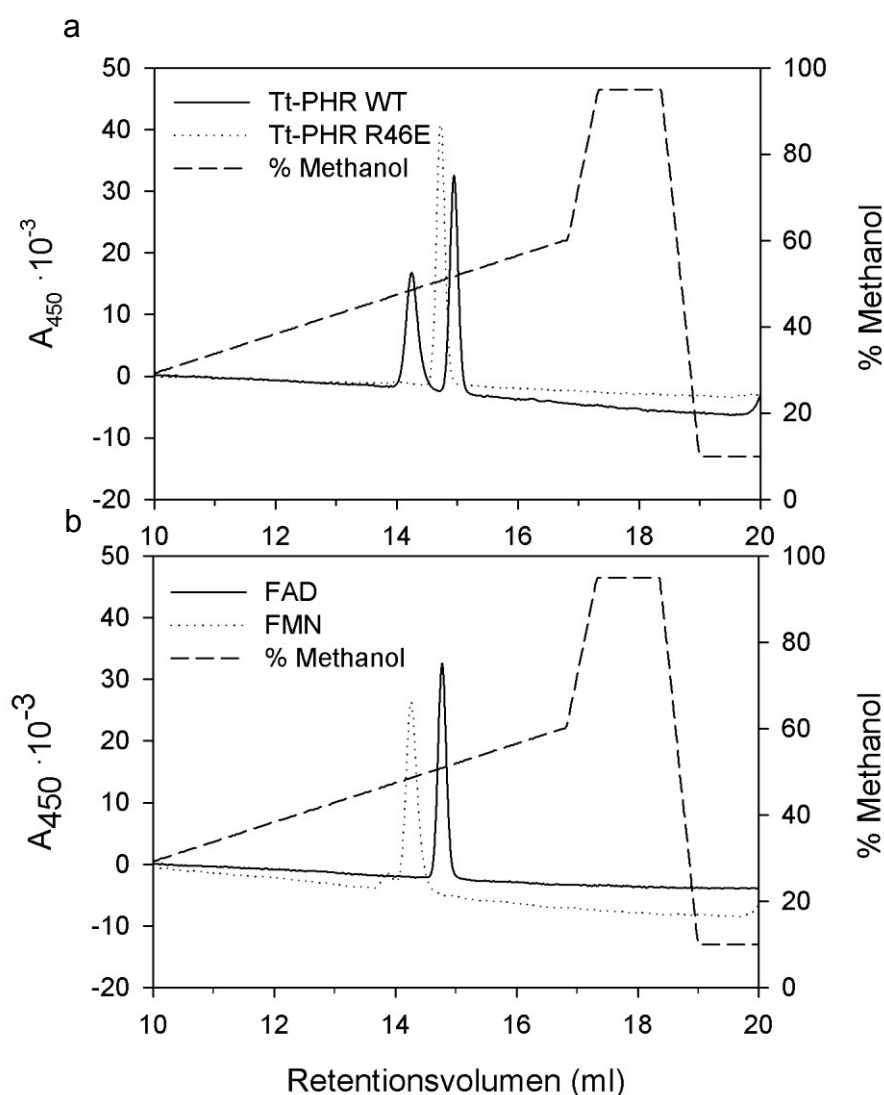
### 3.1.2 *Thermus thermophilus* Photolyase

In *Escherichia coli* rekombinant überexprimiert bindet die CPD-Photolyase aus *Thermus thermophilus* FMN als zweiten Kofaktor. Hier soll gezeigt werden, ob die Belegung der Antennenbindetasche durch FMN vollständig ist und ob FMN als Antennenchromophor fungiert und die absorbierte Lichtenergie auf den katalytisch aktiven FAD-Kofaktor übertragen kann.

#### 3.1.2.1 Bindung der Cofaktoren

Zur Analyse der von Tt-PHR WT und Tt-PHR R46E gebundenen Cofaktoren wurden die Proteinbestandteile des Holoproteins enzymatisch abgebaut, und die entlassenen Cofaktoren durch Reverse Phase Chromatografie getrennt. Dieses Verfahren war aufgrund der gegebenen methodischen Schwierigkeiten notwendig (s. Kap. 2.4.3.1). Die Cofaktoren wurden dann durch direkten Vergleich von Retentionsvolumina und Peakflächen der Proben mit Standardflavinen identifiziert und quantifiziert.

Die in Abbildung 3.2 dargestellten Chromatogramme für die von Tt-PHR WT und Tt-PHR R46E abgelösten Cofaktoren zeigen, dass die Substitution von Arginin zu Glutamat an Position 46 zu einem vollständigen Verlust der FMN-Bindung führt. Zudem beträgt das molare Verhältnis von FAD zu FMN für Tt-PHR WT 1:1.



**Abbildung 3.2 Chromatogramme der Flavinbestimmung von Tt-PHR WT und Tt-PHR R46E**

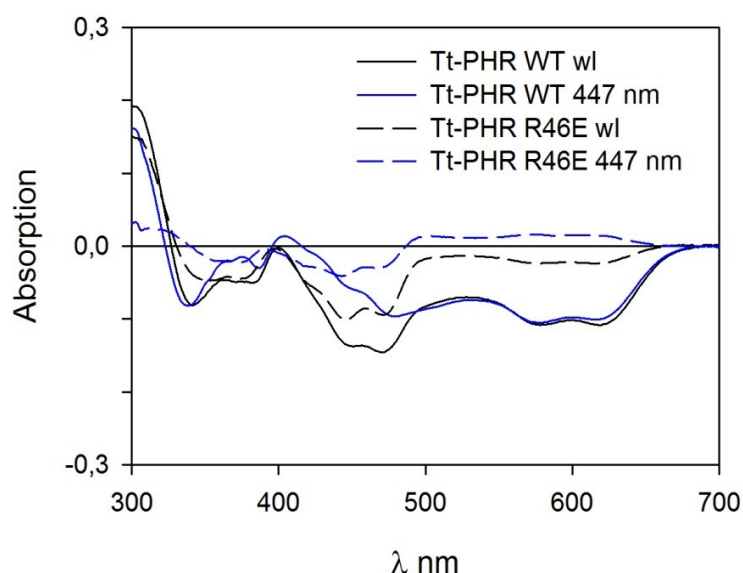
**a** Für die Flavinbestimmung von Tt-PHR WT und Tt-PHR R46E wurden der Proteinanteil der Photolyasen proteolytisch verdaut und die Cofaktoren chromatographisch getrennt. Die Flavine wurden während der Elution durch einen Methanolgradienten (rechten Ordinaten) durch ihre Absorption bei 450 nm detektiert (linken Ordinaten). **b** Als Vergleichsproben wurden FAD- und FMN-Standards mit bekannter Konzentration mit BSA komplementiert und wie die Photolyaseproben behandelt und getrennt. Identifizierung und Quantifizierung erfolgten dann durch den direkten Vergleich der Retentionsvolumina und der Peakflächen.

### 3.1.2.2 Die Rolle der FMN-Antenne bei Photoreduktion und Photoreaktivierung

#### 3.1.2.2.1 Photoreduktion

Zur Analyse der Photoreduktion wurden die beiden Photolyasevarianten in Reaktionspuffer (10 mM NaP; Puffer pH 7,5; 150 mM NaCl; 10 mM DTT) auf zwei Küvetten verteilt und Wildtyp und Mutante einzeln im Zweistrahlenspektrometer vermessen. Zwischen den Messungen wurde die Probenküvette aus dem Messraum des Spektrometers entnommen, dieser wieder verschlossen und die Probenküvette bestrahlt. Das anschließend gegen die nicht bestrahlte Referenzküvette aufgenommene Differenzspektrum zeigt die lichtabhängige Änderung der Absorption der bestrahlten Probe als Folge der lichtabhängigen Änderung des Redoxzustands des FAD. Da die Halbwertszeit des reduzierten Flavins in Anwesenheit von Sauerstoff zu kurz war, um ein ausreichendes Signal für die spektroskopische Untersuchung

zu akkumulieren, wurden die Proben vor der Messung durch Glukoseoxidase anaerobisiert (s. Kap. 2.4.4.2). Für die Bestrahlungen mit beiden Lichtqualitäten wurde ein Diaprojektor mit einer 250 W Halogenlampe eingesetzt. Für die Weißlichtbestrahlung wurde er mit einem 320 nm Langpassfilter und für die Blaulichtbestrahlung mit einem 477 nm Interferenzfilter (beide Schott, Mainz) ausgerüstet. Die resultierenden Differenzspektren sind in Abbildung 3.3 gezeigt.



**Abbildung 3.3 Differenzspektren der Photoreduktion von Tt-PHR WT und Tt-PHR R46E**

Differenzspektren der Photoreduktion von Tt-PHR WT (durchgezogene Linien) und Tt-PHR R46E (gestrichelte Linien) unter Weißlicht mit  $2500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (schwarze Linien) und Blaulicht mit  $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bei 477 nm (blaue Linien). Alle Proben wurden für 32 min unter anaeroben Bedingungen bestrahlt.

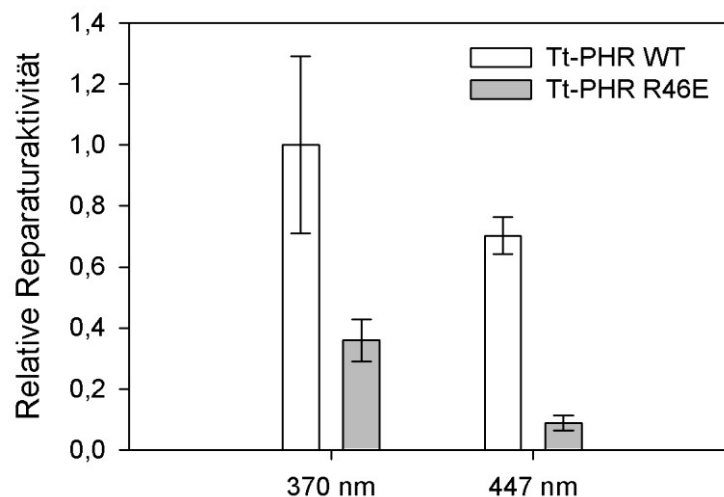
Die Differenzspektren der Weißlichtbestrahlung mit  $2500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  zeigten für beide Photolyasen eine lichtabhängige Abnahme des FAD und  $\text{FADH}^0$ , wobei die Kinetik der WT Tt-PHR eine deutlich schnellere Abnahme der oxidierten Flavin Spezies zeigte als für die Tt-PHR R46E Mutante. Auffällig ist in beiden Spektren die Verschiebung des Verhältnisses der Absorption bei 360 nm und 450 nm. Dies erklärt sich aus der Akkumulation des  $\text{FADH}^-$ . Seine Zunahme und die damit verbundene Absorptionszunahme bei 360 nm wirkt der Absorptionsabnahme durch die Reduktion der beiden anderen Flavinspezies bei dieser Wellenlänge entgegen. Bei Blaulichtbestrahlung mit  $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bei 477 nm ergibt sich ein vollkommen anderes Bild. Während bei Tt-PHR WT durch die Absorptionsänderungen sowohl eine Abnahme der voll oxidierten und semireduzierten Flavinspezies zu beobachten ist, zeigt die Tt-PHR R46E Mutante nur eine Abnahme des vollständig oxidierten Flavins, wohingegen die semireduzierten Formen akkumulierten.

#### 3.1.2.2.2 Photoreaktivierung

Um den Einfluss der FMN-Antenne auf die Reparaturaktivität der Tt-PHR zu analysieren, wurden beide Proteinvarianten in durch Glukoseoxidase anaerobisierten Reaktionspuffer (10 mM  $\text{NaP}_i$ ; Puffer pH 7,5; 150 mM NaCl; 10 mM DTT) gegeben und durch Weißlichtbestrahlung vollständig photoreduziert. Anschließend wurde UV-B bestrahlte Salmon Sperm DNA als Substrat zugegeben, eine Dunkelprobe entnommen und die Proben mit monochromatischem Blau- ( $\lambda_{\text{max}}$  477 nm,  $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) oder UV-A Licht ( $\lambda_{\text{max}}$  370 nm,



$31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) bestrahlt. Während der Bestrahlung wurden in 4 min Intervallen Proben genommen und das Enzym sofort durch Durchmischen mit Phenol/Chloroform inaktiviert. Der CPD-Gehalt der DNA wurde dann mittels ELISA bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Die Steigung der sich ergebenden Gerade wurde um die Photonenfluenz und die eingesetzte Proteinmenge korrigiert, gegen den UV-A Wert des Tt-PHR WT normalisiert und die sich ergebenden Werte in Abbildung 3.4 aufgetragen.



**Abbildung 3.4 Reparaturaktivität von WT Tt-PHR und Tt-PHR R46E**

Relative Reparaturaktivität von mit Weißlicht photoreduzierter WT Tt-PHR und Tt-PHR R46E bei 447 nm und 370 nm, korrigiert gegen Fluenz und Enzymmenge. Die Balken zeigen den Standardfehler wobei (n=8).

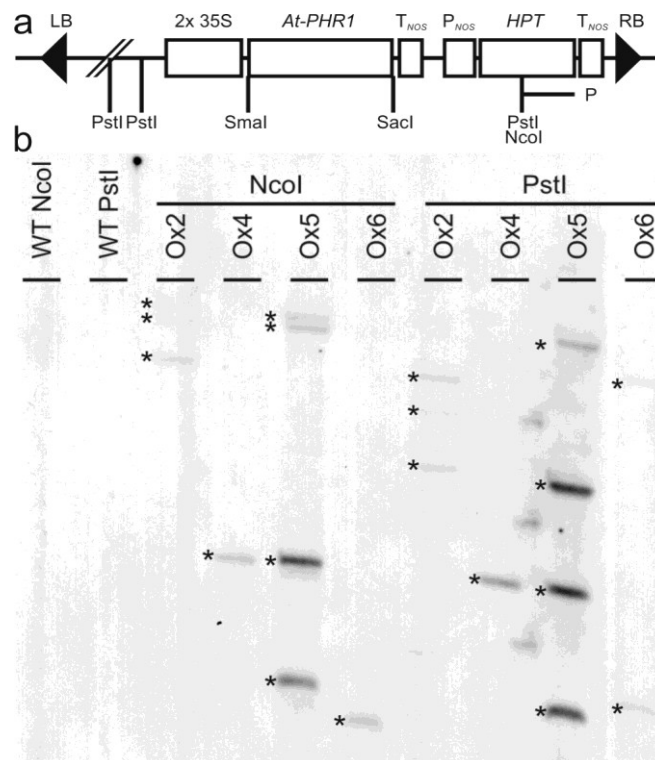
Beide Enzyme zeigen bei beiden Lichtqualitäten Enzymaktivität. Erkennbar ist, dass WT Tt-PHR bei beiden Wellenlängen eine deutlich höhere Aktivität zeigt. Der Abfall der Aktivität im blauen Licht im Vergleich zu Weißlicht für die WT Tt-PHR beträgt 30%, der für die Tt-PHR R46E Mutante jedoch 76%.

## 3.2 Ergebnisse der *in planta* Untersuchungen an CPD-Photolyase überexprimierenden Linien

UV-B Belastung hat schwerwiegende negative Auswirkungen auf das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen. Von daher haben sie komplexe Schutz- und Reparaturmechanismen entwickelt. Hier soll untersucht werden, welchen Einfluss die Überexpression von CPD-Photolyase auf die DNA-Reparatur und das Wachstum von *Arabidopsis thaliana* unter UV-B Belastung hat.

### 3.2.1 Transformation

Zur Kontrolle der Transformation und um die Zahl der ins Genom inserierten Kopien der T-DNA zu bestimmen, wurde aus den transgenen Linien gesamte DNA extrahiert, diese durch Restriktionsenzyme geschnitten und die T-DNA in den Fragmenten mittels Southern Blot nachgewiesen. Durch PstI- und NcoI-Verdau entsteht zwischen den Schnittstellen im *HPT*-Gen, welches sich auf der T-DNA befindet, und der nächsten Schnittstelle außerhalb der Right Border im Genom der Pflanze ein Fragment, welches 740 bp des *HPT*-Gens sowie den anschließenden *NOS*-Terminator enthält. Zur Synthese einer Sonde, die spezifisch mit diesem Fragment hybridisieren kann, wurde der entsprechende Teil des *HPT*-Gens durch PCR mit den Primern HPT F und HPT R aus dem Binären Vektor pPCV812 2x35S::At-PHR1 amplifiziert und das Produkt als Template für das DIG DNA Labeling Kit genutzt. Mit der so generierten Sonde wurden dann die T-DNA tragenden Fragmente nach der elektrophoretischen Trennung und dem anschließenden Blotten via Southern Blot nachgewiesen.



**Abbildung 3.5 Analyse der Kopienzahl der T-DNA in die transgenen 35S::At-PHR1-Linien**

**a** Schematische Darstellung der T-DNA für die Transformation. LB left border, RB right border, 2x 35 S CaMV 35 S Tandempromotor, *At-PHR1* kodierende Region des *At-PHR1* Gens, T<sub>NOS</sub> Nopalinsynthase Terminator, P<sub>NOS</sub> Nopalinsynthase Promotor, *HPT* Hygromycinphosphotransferase, *P* Sonde für den Southern Blot. **b** Southern Blot von Wildtyp (WT) und Photolyase überexprimierenden Linien (Ox 2, 4, 5, 6). Gesamt DNA wurde präpariert, mit NcoI oder PstI geschnitten, die resultierenden Fragmente durch Agarosegel Elektrophorese getrennt und auf eine Hybond-N<sup>+</sup> Membran gebロットet. Diese wurde dann mit einer DIG-markierten Sonde gegen das auf der T-DNA kodierte *HPT* Gen hybridisiert. Resultierende Banden sind mit einem Sternchen markiert.

Der resultierende Blot (Abbildung 3.5 b) zeigt kein Signal für NcoI oder PstI geschnittene WT DNA, was unspezifische Signale durch die Detektion mit der verwendeten Sonde ausschließt. In den Spuren mit NcoI geschnittener DNA können für Ox2 drei, für Ox4 eine, für Ox5 vier und für Ox6 eine Bande detektiert werden. In Spuren, in denen PstI geschnittene DNA getrennt wurde, kann für die Linien Ox2, Ox4 und Ox5 die gleiche Anzahl an Banden festgestellt werden. In der Spur für Ox6 jedoch erscheint eine weitere Bande. Hiernach entspricht die Anzahl an Banden im Southern Blot der Kopienzahl der in das Genom inserierten T-DNAs und beträgt für Ox2, Ox4 und Ox5, jeweils drei, eins und vier, wohingegen Ox6 mindestens eine aber wahrscheinlicher zwei Insertionen der T-DNA trägt.

### 3.2.2 Analyse der At-PHR1-Expression

Um die Funktionalität des transformierten Konstruktes zu überprüfen, wurde die Expression der *At-PHR1* auf Transkript- und Proteinebene getestet.

#### 3.2.2.1 Analyse der At-PHR1-Expression auf transkriptioneller Ebene

Zur Bestimmung der *At-PHR1* Transkriptmengen wurde gesamte RNA aus Rosettenblättern von acht Wochen alten Pflanzen, die im Kurztag gehalten wurden, extrahiert, diese enzymatisch von DNA befreit und revers mit oligo-dT Primer in cDNA transkribiert. Die so generierte cDNA-Bank wurde dann für die quantitative Transkriptanalyse mittels Realtime PCR mit den Primern RT *At-PHR1* F und RT *At-PHR1* R1 eingesetzt. Zur Normierung der *At-*

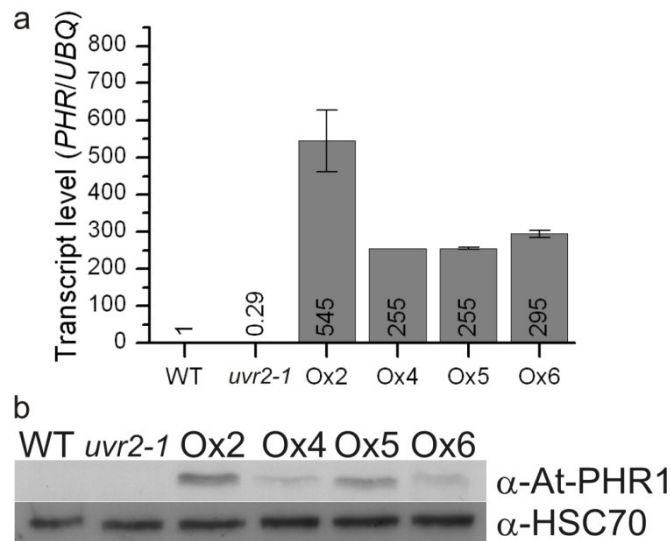
*PHR1* Transkriptmengen wurde das konstitutiv exprimierte *UBQ*-Transkript genutzt. Dieses wurde mit den Primern RT *At-UBQ* F und RT *At-UBQ* R amplifiziert und die Messwerte für *At-PHR1* in Relation zu diesen gesetzt. Abschließend wurden alle *At-PHR1/At-UBQ* Verhältnisse gegen den Wildtyp normalisiert. Um Verunreinigungen der cDNA-Bank mit genomischer DNA auszuschließen, wurde ein zweites Primerpaar (RT *At-PHR1* F / RT *At-PHR1* R2) eingesetzt, bei dem der Reverseprimer im ersten Intron des *At-PHR1*-Gens bindet.

Die resultierenden Werte sind in Abbildung 3.6 a aufgetragen. Im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen ist das Transkriptlevel für die Linie Ox2 um das 550 fache und für die Linien Ox4, Ox5 und Ox6 zumindest um den Faktor 250 erhöht. Dies zeigt deutlich die erhöhte Expression des *At-PHR1* Gens unter Kontrolle des starken und konstitutiven CaMV 35S Promotortandems. Die PCR-Reaktionen mit dem intronspezifischen Primerpaar RT *At-PHR1* F / RT *At-PHR1* R2 ergaben kein Produkt und schließen eine Verfälschung der Ergebnisse durch Kontamination der Proben mit genomischer DNA aus.

### 3.2.2.2 Analyse der *At-PHR1*-Expression auf posttranskriptioneller Ebene

Um die Überexpression von *At-PHR1* auf posttranskriptioneller Ebene zu untersuchen, wurde das lösliche Protein aus Rosettenblättern von acht Wochen alten Pflanzen aus Kurztagkultur extrahiert. Hierzu wurde das Gewebe in Extraktionspuffer zerrieben und die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (s. Kap. 2.4.1.2). Die im wässrigen Überstand gelösten Proteine wurden darauf hin auf einem 10%igen Lämmigel getrennt und im Semidry Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert (s. Kap. 2.4.1.4). Das vorhandene *At-PHR1* Protein wurde dann immunologisch durch einen gegen sein Epitop gereinigten  $\alpha$ -*At-PHR1* Antikörper mittels ECL Western Blot nachgewiesen. Um Fehler bei der Beladung des Gels oder beim Transfer auszuschließen, wurde die Membran anschließend gestrippt und mit einem polyklonalen Antikörper gegen das konstitutiv exprimierte HSC70 Protein entwickelt.

Die exponierten Filme sind in Abbildung 3.6 b gezeigt. Der Blot gegen CPD Photolyase zeigt in den Spuren für Wildtyp Pflanzen und Photolyase Mutante *uvr2-1* kein detektierbares Signal. Die Spuren für die Linien Ox4 und Ox6 zeigen ein schwaches aber klar identifizierbares und die Spuren für die Linien Ox2 und Ox5 ein relativ starkes Signal. Der gestrippte und dann mit  $\alpha$ -HSC70 entwickelte Blot zeigt in allen Spuren ein gleichmäßig starkes Signal, was eine gleichmäßige Beladung und Transfer des Gels bestätigt. Diese Befunde zeigen auch, dass die Expression des *At-PHR1* Gens unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors im Vergleich zum Wildtyp zu einer deutlichen Erhöhung des CPD-Photolyase-Proteins führt.

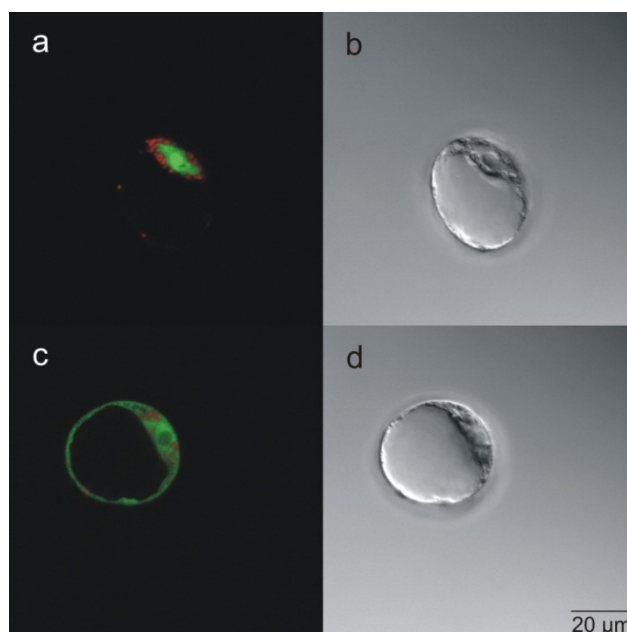


**Abbildung 3.6 Expression des *At-PHR1* Gens**

**a** *At-PHR1* Transcriptlevel von Wildtyp (WT), Photolyase überexprimierenden Linien (Ox 2, 4, 5, 6) und CPD-Photolyase Mutante *uvr2-1*. Die Pflanzen wurden für acht Wochen unter Kurztag Bedingungen in Töpfen kultiviert. RNA wurde aus Rosettenblättern isoliert und die Transkriptlevel durch qRT-PCR bestimmt und gegen Ubiquitin (*UBQ*) Transkriptlevel normalisiert. Das WT Transkriptlevel wurde gleich 1 gesetzt. Die Balken zeigen den Standardfehler (n=4). **b** Western Blot Analyse der *At-PHR1* Proteinlevel. Die Pflanzen wurden wie für **a** angezogen. Aus Rosettenblättern wurde das lösliche Gesamtprotein extrahiert und durch SDS-PAGE getrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit einem  $\alpha$ -*At-PHR1* Antikörper entwickelt. Anschließend wurde die Membran gestrippt und mit einem  $\alpha$ -HSC70 Antikörper entwickelt, um Fehler bei der Beladung oder dem Transfer des Gels auszuschließen. Der HRP fusionierte sekundäre Antikörper wurde dann durch Chemolumineszenz mit einem Röntgenfilm detektiert.

### 3.2.3 Zelluläre Lokalisation von *At-PHR1*

Zur zellulären Lokalisation von CPD-Photolyasen *in planta* gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben (Draper & Hays, 2000; Hada *et al.*, 2000a). Um dies weiter zu untersuchen und um die zelluläre Lokalisation der überexprimierten *At-PHR1* zu kontrollieren, wurde das Enzym C-terminal mit GFP fusioniert, transient in Mesophyll Protoplasten transformiert und die zelluläre Lokalisation durch KLSM überprüft. Hierfür wurde die cDNA der *At-PHR1* mit den Primern *At-PHR1* => pAVA393 F und *At-PHR1* => pAVA393 R aus pPCV812 2x35S::*At-PHR1* amplifiziert in pGEM-T Easy zwischenkloniert, sequenziert und mit den an den Primern befindlichen NcoI Schnittstellen in pAVA393 kloniert. Nach Kontrolle der richtigen Orientierung des Inserts wurde das resultierende Plasmid pAVA393 *At-PHR1* präpariert und in Protoplasten transformiert. Als Kontrolle diente ein pAVA393 Vektor, der nur GFP enthält. Die zelluläre Lokalisation des GFP wurde dann mittels KLSM bei Anregung mit 488 nm Blaulicht und einem Lochblenden Durchmesser von 1 Airy bestimmt.



**Abbildung 3.7 Zelluläre Lokalisation von At-PHR1**

*Arabidopsis* Protoplasten die *At-PHR1::GFP* (a, b) oder *GFP* (c, d) unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors exprimieren im konfokalen mikroskopischen Bild. Die Bilder a und c zeigen übereinandergelegt in grün Kanal 1 (500-552 nm) und in rot Kanal 2 (667-743 nm). Die Bilder b und d zeigen die in a und c gezeigten Zellen im Differenzialinterferenzkontrast-Bild.

Abbildung 3.7 zeigt die resultierenden mit KLSM aufgenommenen Bilder. Im grün dargestellten Kanal 1 (500-552 nm) wird die grüne Fluoreszenzemission des GFP ( $\lambda_{\max}$  509 nm) detektiert, im rot dargestellten Kanal 2 (667-743 nm) die rote Autofluoreszenzemission der Chloroplasten ( $\lambda_{\max}$  666 nm). In monochrom sind die Differenzialinterferenzkontrast-Bilder der links stehenden Fluoreszenzbilder dargestellt. GFP alleine findet sich wie erwartet in gleichmäßiger Verteilung in Cytoplasma und Kern, ist jedoch vom Nukleolus ausgeschlossen (Abbildung 3.7 c). Die Lokalisation des *At-PHR1::GFP* Fusionsproteins hingegen ist auf den Kern beschränkt, wo es auch Zugang zum Nukleolus hat (Abbildung 3.7 a).

### 3.2.4 Effekte der *At-PHR1*-Überexpression auf die CPD-Akkumulation und das Wachstum der Pflanzen unter UV-Belastung

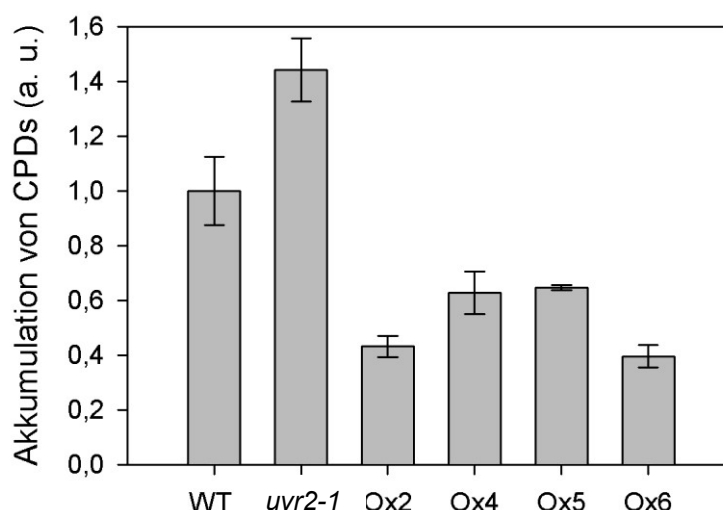
Um einen möglichen positiven Effekt der Photolyase-Überexpression auf die Pflanzen unter UV-Stress zu untersuchen, wurde die Akkumulationsrate von CPDs unter UV-B Bestrahlung gemessen. Zudem wurden Rosettendurchmesser, Frisch- und Trockenmasse der Photolyase überexprimierenden Linien unter steigendem UV-Stress im Vergleich zu Wildtyp Pflanzen und der CPD-Photolyase Nullmutante *uvr2-1* gemessen.

#### 3.2.4.1 Akkumulation von CPDs unter UV-Bestrahlung

Die Bestimmung der Akkumulationsrate von CPDs wurde als Maß für den Schutz der DNA durch die unterschiedlichen Photolyase Expressionsstärken genutzt. Hierfür wurden Rosettenblätter von acht Wochen alten Pflanzen aus Kurztagkultur auf  $\frac{1}{2}$  MS Platten ausgelegt und mit Ultraviolett-B TL 40W/12 RS Leuchtstoffröhren, die sowohl UV-B als auch UV-A emittieren, bestrahlt (s. Kap. 2.4.4.3). Aus den bestrahlten Blättern wurde dann Gesamt-DNA isoliert und der CPD-Gehalt durch ELISA bestimmt (s. Kap. 2.4.4.4). Für jeden Zeitpunkt wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Die ermittelten Werte wurden in

Relation zu einer Probe mit konstanter CPD-Menge gesetzt, für die einzelnen Zeitpunkte der Mittelwert gebildet und dieser gegen die Bestrahlungszeit aufgetragen. Die Steigung der sich ergebenden Geraden, welche die Akkumulationsrate der CPDs repräsentiert, und ihr Standardfehler wurden errechnet und die Werte gegen den Wert der Wildtyp Pflanzen normalisiert. Sie sind, unter der Annahme, dass die Rate der CPD-Bildung in allen Linien gleich ist, umgekehrt proportional zur Photolyase Aktivität.

In der CPD-Photolyase Mutante *uvr2-1* ist die Akkumulationsrate im Vergleich zu Wildtyp um 45% erhöht (Abbildung 3.8). In den Linien Ox4 und Ox5 ist die Akkumulationsrate hingegen auf 60% und in den Linien Ox2 und Ox6 auf 40% im Bezug zum Wildtyp reduziert. Dieses Experiment zeigt deutlich, dass die Rate der CPD-Akkumulation in der CPD-Photolyasemutante im Vergleich zum Wildtyp erhöht in den CPD-Photolyase überexprimierenden Linien jedoch reduziert ist.

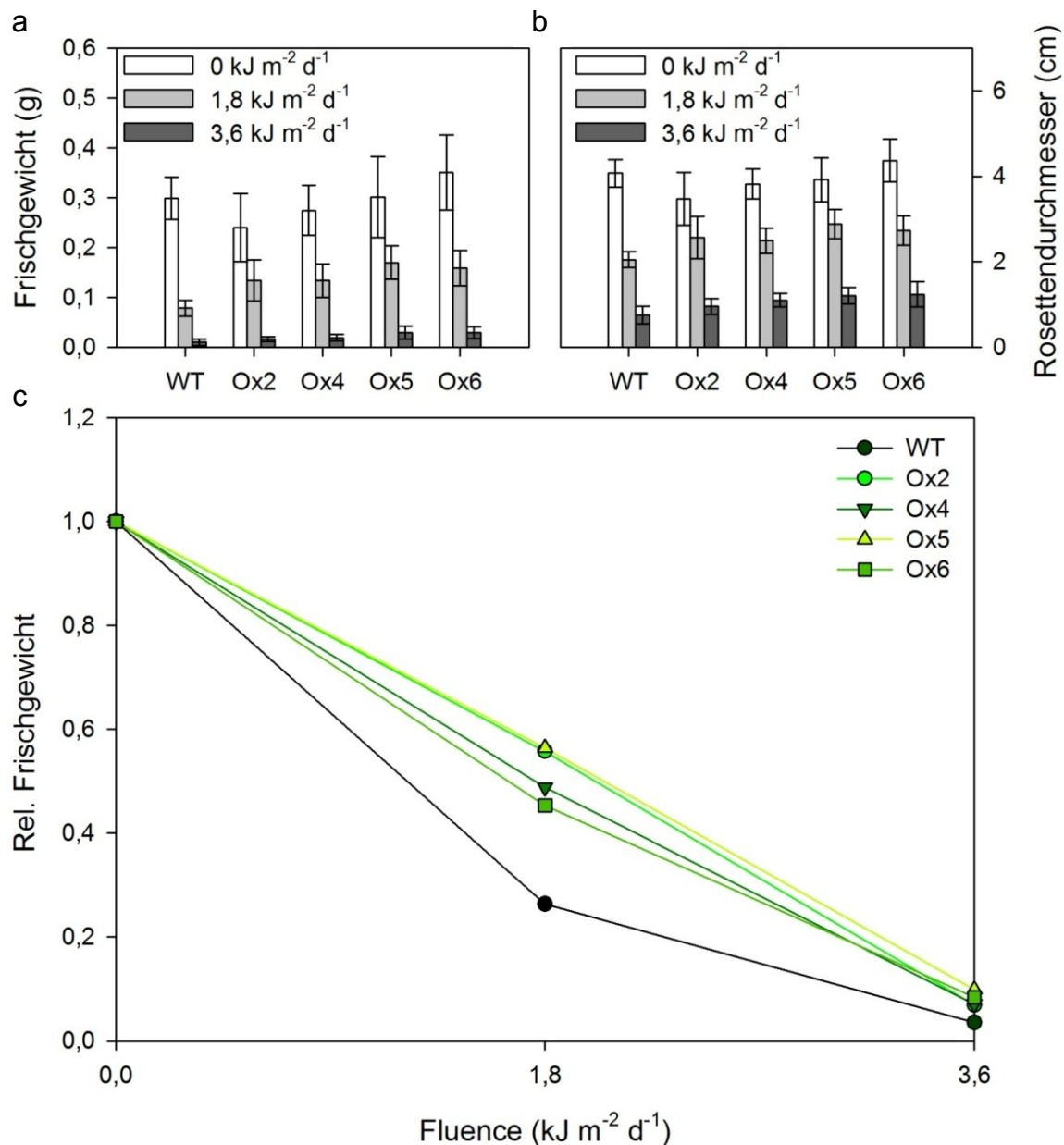


**Abbildung 3.8 Akkumulation von CPDs unter UV-Bestrahlung**

Die Pflanzen wurden für acht Wochen unter Kurztag Bedingungen in Töpfen kultiviert, einzelne Rosettenblätter auf ½ MS Agarplatten ausgelegt und mit polychromatischem UV-B und UV-A für unterschiedliche Zeiten bestrahlt. Aus den Blättern wurde gesamte DNA isoliert und der CPD-Gehalt mit einem monoklonalen  $\alpha$ -CPD Antikörper mittels ELISA bestimmt. Die Akkumulationsrate der CPDs wurde gegen die Zeit errechnet, der Wert für den WT willkürlich gleich 1 gesetzt und die Werte der anderen Genotypen hiergegen normalisiert. WT Wildtyp, *uvr2-1* CPD Photolyasemutante, Ox 2, 4, 5, 6 Photolyase überexprimierende Linien. Die Balken zeigen den Standardfehler mit  $n = 5$ .

### 3.2.4.2 Einfluss von UV-Bestrahlung auf das Wachstum

Um den Einfluss erhöhter UV-Belastung auf das Wachstum der Pflanzen zu untersuchen, wurden diese in einem 14 h Licht 10 h Dunkel Zyklus angezogen und nach einer Woche Akklimation in der Mitte der Lichtphase mit Ultraviolett-B TL 40W/12 RS (Philips, Amstelveen, Niederlande) Leuchtstoffröhren bestrahlt. Um eine gleichmäßige Bestrahlung der Pflanzen zu gewährleisten, wurden die Positionen der Töpfe täglich gewechselt. Nach 16 Tagen wurde dann das Frisch- und Trockengewicht und nach 14 Tagen der Rosettendurchmesser der Pflanzen gemessen. Der Einfluss von UV und Genotyp auf das Wachstum wurde mittels zwei Wege ANOVA analysiert und die Mittelwerte signifikanter ANOVA-Resultate mit dem Tukey HSD Post hoc Test auf die Signifikanz ihrer Differenzen getestet. Die Resultate sind in Abbildung 3.9 gezeigt.



**Abbildung 3.9 Einfluss von UV-B auf das Pflanzenwachstum**

**a** Frischgewicht von Wildtyp Pflanzen (WT) und CPD-Photolyase überexprimierenden Linien (Ox2, 4, 5, 6). Die Pflanzen wurden in der Klimakammer unter Langtag Bedingungen ohne UV-B für 7 Tage angezogen und für weitere 16 Tage entweder ohne UV-B oder mit einer täglichen UV-B Dosis von 1,8 oder 3,6 kJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> kultiviert. Die Säulen zeigen das durchschnittliche Frischgewicht, die Balken die Standardabweichung (n=10). **b** Rosettendurchmesser der unterschiedlichen Genotypen (Beschriftung wie **a**). Die Pflanzen wurden in der Klimakammer unter Langtag Bedingungen ohne UV-B für 7 Tage angezogen und für weitere 14 Tage entweder ohne UV-B oder mit einer täglichen UV-B Dosis von 1,8 oder 3,6 kJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> kultiviert. Die Säulen zeigen das durchschnittliche Frischgewicht die Balken die Standardabweichung (n=10). **c** Frischgewicht relativ zur UV-B freien Probe der unterschiedlichen Genotypen aufgetragen gegen die Fluenz (Beschriftung wie **a**). Errechnet aus den in **a** gezeigten Daten.

Ohne UV-Bestrahlung zeigt keiner der untersuchten Genotypen einen signifikanten Unterschied zu den Wildtyp Pflanzen. Dies zeigt, dass die Überexpression von *At-PHR1* keine negativen Folgen für die Pflanzen hat. UV-Bestrahlung mit 1,8 oder 3,6 kJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> führt zu einer dosisabhängigen Verringerung der Rosettendurchmesser bei allen Genotypen. Auch wenn alle Photolyase-überexprimierenden Linien bei beiden Fluenzen im Mittelwert eine



geringere Reduktion des Wachstums der Rosettenblätter zeigen (Abbildung 3.9 b), sind diese Unterschiede zum Wildtyp jedoch nicht signifikant (ANOVA,  $F_{2, -165} = 163,47$ ,  $P > 0,05$ ). Neben dem Rosettendurchmesser wurden zudem Frisch- und Trockengewicht der Pflanzen bestimmt. Hier sind die Unterschiede zwischen den Photolyase-überexprimierenden Linien und den Wildtyp Pflanzen signifikant (ANOVA,  $F_{8, 165} = 2,00$ ,  $P < 0,049$ ). UV-Bestrahlung von Wildtyp Pflanzen mit  $1,8$  oder  $3,6 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  führen zu einer Reduktion des Frischgewichtes auf  $26\%$  und  $3\%$  des Frischgewichtes von Pflanzen, die nicht mit UV bestrahlt wurden. Die Reduktion des Frischgewichts durch die UV-Bestrahlung der Photolyase-überexprimierenden Linien beträgt  $56, 49, 56$  und  $45\%$  bei  $1,8 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  und  $7, 7, 10$  und  $8\%$  bei  $3,6 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  für Ox2, 4, 5 und 6 (Abbildung 3.9 a). Trägt man den relativen Verlust des Frischgewichtes gegen die Fluenz auf (Abbildung 3.9 c), ist zu erkennen, dass der Frischgewichtsverlust der Photolyase-überexprimierenden Linien bei den gegebenen Fluenzen linear verläuft und etwa  $25\% (\text{kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1})^{-1}$  beträgt. Der Frischgewichtsverlust der Wildtyp Pflanzen hingegen liegt bei den gegebenen Fluenzen jedoch bereits deutlich in der Saturierung. Er beträgt, abgeschätzt zwischen den Datenpunkten für  $0$  und  $1,8 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , etwa  $47\% (\text{kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1})^{-1}$ . Das Trockengewicht korreliert strikt mit den entsprechenden Frischgewichten und beträgt für alle Datenpunkte etwa  $10\%$  des Frischgewichts.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der *in vitro* Experimente

#### 4.1.1 *Arabidopsis thaliana* Photolyase

##### 4.1.1.1 Reinigung der At-PHR1

Mit einer Ausbeute von 2,5 – 3 mg At-PHR1 pro Liter Kultur und einer Reinheit von mindestens 99,5% ist die Expression und die Reinigung des Enzyms zwar nicht sehr effizient, die Reinheit jedoch für Kristallisationsexperimente ausreichend. Zudem ist die Ausbeute nicht so gering, dass eine Kristallisation aufgrund fehlenden Ausgangsmaterials unmöglich wäre. Mit dem hier vorgestellten Protokoll ist es somit möglich, At-PHR1 mit gebundenem katalytischem FAD auch in größeren Mengen in sehr guter Reinheit für biochemische oder biophysikalische Untersuchungen zu produzieren. So konnte das so gereinigte Protein für die in Okafuji (2010) beschriebenen Studien zur Photoreduktion von Klasse II CPD-Photolyasen genutzt werden.

##### 4.1.1.2 Kristallisation der At-PHR1

Trotz erheblichem experimentellen Aufwand, die Kristallisationsexperimente wurden bei 4°C unter Sicherheitslicht im Anaerobenzelt durchgeführt, konnten bei keiner der 780 auspipettierten Kristallisationsbedingungen Anzeichen für eine beginnende Kristallisation der At-PHR1 gefunden werden. Im Rahmen der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit waren die Kristallisationsversuche mit einem vergleichbaren Probenumfang ebenfalls ohne Erfolg. Da in der kooperierenden Arbeitsgruppe von Professor Essen vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg erste Erfolge mit der Kristallisation der Klasse II CPD-Photolyase aus *Methanosarcina mazei* gemacht wurden, die erfolgreich abgeschlossen werden konnten (Kiontke *et al.*, 2011), wurde dieses Projekt eingestellt.

#### 4.1.2 *Thermus thermophilus* Photolyase

Die Analysen zur Cofaktorbindung von WT Tt-PHR und Tt-PHR R46E zeigen deutlich, dass die Substitution von Arginin 46 zu Glutamat zu einem vollständigen Verlust der FMN-Bindung führt. Durch die Kristallisationsexperimente ist bekannt, dass das Protein FAD stöchiometrisch bindet (Klar *et al.*, 2006). Bei der WT Tt-PHR beträgt das molare Verhältnis beider Flavine 1:1 also ist die FMN-Bindung nach Rekonstitution ebenfalls stöchiometrisch. Die Rekonstitution des Proteins mit FMN ist also vollständig.

Dass beide Tt-PHR Varianten in der Lage sind, lichtabhängig ihren katalytisch aktiven FAD Cofaktor zu reduzieren, zeigen die Photoreduktionsexperimente mit Weißlicht. Auffällig ist hier die bessere Quantenausbeute der WT Tt-PHR, die an der rascheren Reduktion des 450 nm Peaks erkennbar ist. Zudem ist WT Tt-PHR bei der Reduktion des auch im Grünlicht absorbierenden  $\text{FADH}^0$  deutlich effektiver als Tt-PHR R46E. Dieses findet sich deutlich verstärkt bei den Photoreduktionsexperimenten mit Blaulicht. Unter Blaulichtbestrahlung photoreduziert WT Tt-PHR sowohl oxidiertes als auch semichinoides FAD zur vollständig

reduzierten Form. Tt-PHR R46E hingegen senkt nur den Anteil des oxidierten FADs, wohingegen der kaum Blaulicht absorbierende Semichinonzustand des FAD akkumuliert. Dies zeigt, dass die Blaulicht-absorbierende FMN-Antenne Energie auf das  $\text{FADH}^0$  überträgt, da dieses ohne diese zusätzliche Energie unter Blaulichtbestrahlung nicht in der Lage ist effizient zu  $\text{FADH}^-$  zu reduzieren. Dieser zusätzliche Energieeintrag durch die funktionale FMN-Antenne ist auch bei der Messung der Enzymaktivität zu beobachten. Beide Enzymvarianten sind katalytisch aktive Photolyasen und spalten CPDs, wobei die WT Tt-PHR generell eine höhere Enzymaktivität zeigt als die Tt-PHR R46E Mutante. Beide reparieren bei UV-A Licht ( $\lambda_{\text{max}}$  370 nm), welches alle Redoxzustände des FAD anregt, schneller als im blauen Licht ( $\lambda_{\text{max}}$  447 nm), welches nur das oxidierte FAD oder FMN effektiv anregt. Die Reduktion der Aktivität bei Blaulicht-Bestrahlung im Vergleich zur UV-A Bestrahlung beträgt bei der WT Tt-PHR nur 30%, wohingegen Tt-PHR R46E 76% seiner Aktivität verliert. Wie bei der Photoreduktion hat die FMN-Antenne einen deutlich positiven Einfluss auf die photochemischen Eigenschaften des Enzyms. Die WT Tt-PHR profitiert deutlich von der durch das FMN absorbierten und auf den katalytisch aktiven Kofaktor übertragenen Energie. Mit einem Absorptionsmaximum bei 445 nm und einer Fluoreszenzemission bei 520 nm ist FMN ein guter Partner für einen Förstertransfer von Energie auf das  $\text{FADH}^0$ , welches ein Absorptionsmaximum bei 579 nm hat. Die Emissionswellenlänge des FMN ist im Vergleich zu den bekannten Photolyase Antennen Pigmenten MTHF ( $\lambda_{\text{max, em}}$  ~460-480 nm (Jorns *et al.*, 1984; Pokorny *et al.*, 2005)) und 8-HDF ( $\lambda_{\text{max, em}}$  470 nm (Eker *et al.*, 1990)) deutlich zum Roten hin verschoben. Hierdurch wird die Überlagerung des Emissionsspektrums der Antenne und des Absorptionsspektrums des  $\text{FADH}^-$ , signifikant reduziert, was einen effektiven Energietransport zwischen diesen beiden Partnern unmöglich macht. Durch Mutanten von *E. coli* Photolyase, welche durch eine Punktmutation in der Tryptophantriade nicht mehr photoreduzieren können, konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym, das Elektron, welches es in den Schaden injiziert, etwa jede 25. Reaktion nicht aus dem reparierten Basenpaar zurückgewinnen kann. Hierdurch verbleibt der Kofaktor im inaktiven  $\text{FADH}^0$  (Kavakli & Sancar, 2004). Geht man davon aus, dass auch Tt-PHR Elektronen während der Reparatur verliert und zieht die schlechte Effizienz des Energietransfers zwischen FMN und  $\text{FADH}^-$  in Betracht, erscheint die achtfach höhere Aktivität der WT Tt-PHR gegenüber der Tt-PHR R46E Mutante im blauen Licht eher ein Effekt der besseren Photoaktivierung, als der verbesserten Quantenausbeute der Reparatur zu sein. Dies müsste jedoch durch weitere Experimente, etwa durch Ultraschnelle Spektroskopie untersucht werden.

Durch die in dieser Arbeit in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Professor Essen am Fachbereich Chemie der Philipps Universität Marburg entwickelten Methodik sollte es möglich sein, die photobiologischen und photochemischen Eigenschaften der Photolyase aus *Thermus thermophilus* durch den Austausch von Antennenpigmenten oder Molekulares Modellieren der Cofaktorbindetaschen zielgerichtet zu verändern. Hierdurch könnte versucht werden, Photolyasen zu designen, die in ihren spektralen Eigenschaften verändert und somit möglicherweise für die spektrale Zusammensetzung des Sonnenlichts auf der Erdoberfläche optimiert sind.

## 4.2 Diskussion der *in planta* Experimente mit *Arabidopsis thaliana* Photolyase

### 4.2.1 Transformation und Expression des 2x35S::At-PHR1 Konstrukts

Der in Abbildung 3.5 dargestellte Southern Blot der transgenen Linien zeigt, dass die Linien eine (Ox4), zwei (Ox6), drei (Ox2) und vier (Ox5) Kopien der T-DNA tragen. Das CaMV 35S Promotortandem führt zu einer starken Induktion des von ihm regulierten *At-PHR1* Gens. Im Vergleich zum Wildtyp ist die *At-PHR1*-Transkriptmenge bei Ox4 und Ox5 um den Faktor 250, für Ox6 um den Faktor 300 und für Ox2 um den Faktor 500 erhöht. Eine klare Korrelation zwischen der Kopienzahl und der Transkriptmenge besteht nicht. Dieses könnte durch Positionseffekte auf den Chromosomen zustande kommen. Auch die Proteinmengen an CPD Photolyase korrelieren nicht perfekt mit den Transkriptmengen. In allen Überexpressionslinien ist die Photolyaseexpression im Western Blot (Abbildung 3.6) jedoch deutlich zu erkennen, wohingegen die Proteinmenge für den Wildtyp unter der Nachweisgrenze des Immunoblots bleibt. Konsistent mit publizierten Arbeiten ist das Fehlen eines Photolyasesignals für die *uvr2-1* Mutante. Diese trägt in Codon 28 des *At-PHR1* Gens eine 1 bp Deletion, welche zu einer Frameshift Mutation und in ihrer Folge zu einem artifiziellen Stopcodon im Codon 40 führt (Ahmad *et al.*, 1997). Auch scheint diese Mutation einen negativen Einfluss auf die Expression des Gens zu haben, da die für die Mutante gemessene Transkriptmenge nur 30% der des Wildtyps entsprach. Für die gesamte Expressionsanalyse lässt sich feststellen, dass die Linie Ox2 auf Transkript- und Proteinlevel die stärkste CPD-Photolyase Expression zeigt. Die niedrigeren Transkriptmengen, die für Ox4 und Ox6 gemessen wurden, korrespondieren mit den gemessenen Proteinmengen, auch wenn die Transkriptmenge bei Ox6 im Vergleich zu Ox4 leicht erhöht ist. Die im Vergleich zu Ox4 und Ox6 erhöhte *At-PHR1* Proteinmenge bei Ox5 korrespondiert nicht mit den für Ox5 gemessenen Transkriptmengen. Da die *At-PHR1* Proteinmenge für den Wildtyp unter der Nachweisgrenze des Immunoblots lag, konnte die Induktionsstärke der Expression für das Enzym nicht ermittelt werden. Für die überexprimierenden Linien gibt es keine perfekte Korrelation zwischen Transkript- und Proteinmenge. Ein Abschätzen der Induktionsstärke auf posttranskriptionalem Niveau über die Transkriptmengen ist also ebenfalls nicht möglich. Die Messung der Enzymaktivität *in vitro* könnte hier für Klarheit sorgen. Jedoch war es nicht möglich mit einem Test, ähnlich dem weiter oben für Tt-PHR beschrieben, Photolyaseaktivität in Proteinextrakten von Wildtyp Pflanzen nachzuweisen. Da dies mit dem weiter unten beschriebenen *in planta* Experiment möglich war, wurde dies nicht weiter verfolgt.

### 4.2.2 Zelluläre Lokalisation von At-PHR1

Die mikroskopischen Studien (Abbildung 3.7) zeigen deutlich, dass die zelluläre Lokalisation des At-PHR1::GFP Fusionsproteins auf den Kern beschränkt ist. Da die zelluläre Lokalisation von GFP alleine gleichmäßig in Cytoplasma und Kern verteilt ist, es jedoch im Gegensatz zum Fusionsprotein vom Nucleolus ausgeschlossen ist, ist die Kernlokalisation des At-PHR1::GFP durch At-PHR1 vermittelt. Da die Photolyase kein klar erkennbares Kern Lokalisations Signal (NLS) besitzt, bleibt es unklar, wie At-PHR1 in den Kern gelangt und dort verbleibt. Würde das Enzym passiv durch Diffusion in den Kern gelangen, könnte seine Affinität zu DNA es dort zurückhalten. *Anacystis nidulans* Photolyase zeigt Reparaturaktivität in menschlicher Haut (Stege *et al.*, 2000) und *E. coli* Photolyase repariert in *Saccharomyces cerevisiae* das

Kerngenom (Yasui *et al.*, 1992). Diese Enzyme können also trotz ihres prokaryonten Ursprungs und somit einem wahrscheinlichen Fehlen einer NLS in den Kern der Zellen gelangen, um dort DNA zu reparieren. Mit einer molaren Masse von 84,1 kDa scheint das At-PHR1::GFP Fusionsprotein jedoch zu groß, um passiv durch die Kernporen diffundieren zu können. Folgerichtig muss der Transport in den Kern aktiv sei, auch wenn bis heute keine NLS identifiziert werden konnte. Die hier gemachte Beobachtung, dass At-PHR1 nicht in Plastiden transportiert wird, ist konsistent mit einer Studie, die in isolierten Plastiden von *Spinacia oleracea* keine lichtabhängige CPD-Reparatur beobachten konnte (Hada *et al.*, 2000a). In einer weiteren Studie an intakten Zellen von *Arabidopsis* (Draper & Hays, 2000) konnte jedoch ein positiver, lichtabhängiger Einfluss von CPD Photolyase auf die Reparatur des Mitochondrien- und Plastidengenoms nachgewiesen werden. Hieraus schlossen die Autoren auf einen direkten Zugang des Enzyms zu den reparierten Genomen. Vor dem Hintergrund der hier präsentierten Ergebnisse scheint dies aber unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist, dass das durch die Photolyase effizient reparierte Kerngenom, welches für die Reparaturfaktoren der Organellen kodiert, diese besser zur Verfügung stellen kann. In *Glycine max* beginnt die lichtabhängige Reparatur des Kerngenoms sofort im Anschluss an die UV-Bestrahlung, während die lichtabhängige Reparatur in den Organellen erst nach einer vierstündigen lag-Phase beginnt, nachdem das Kerngenom bereits fast vollständig repariert ist (Cannon *et al.*, 1995). Am Beginn der Reparatur befanden sich also keine aktiven Reparaturfaktoren in den Chloroplasten, sie sind erst mit fortschreitender Reparatur des Kerngenoms dort aktiv geworden. Fraglich bleibt jedoch, ob diese Reparatur direkt durch eine Photolyase vermittelt wird. In *Arabidopsis* ist die lichtabhängige Reparatur der Organellengenome von einem funktionellen At-PHR1-Allel abhängig (Draper & Hays, 2000; Reisbacher, 2009). Eine weitere, bis heute unbekannte Photolyase ist also nicht an diesem Prozess beteiligt. Möglich wäre es, dass eine Splicevariante des At-PHR1-Transkripts ein Targeting Signal für die Organellen trägt. Für den BER-Faktor At-MMH, eine Glykosylase, die die spezifische Reparatur oxidiert Purine initiiert und die an der DNA-Reparatur beteiligte DNA-Ligase 1 (At-LIG1) ist bekannt, dass es Splicevarianten mit unterschiedlichen Targeting Signalen gibt (Murphy & Gao, 2001; Sunderland *et al.*, 2006). Eine Lokalisation der At-PHR1 in den Organellen, die auf verschiedenen Splicevarianten beruht, könnte mit dem hier gezeigten Experiment nicht nachgewiesen werden, da nur die cDNA des Gens in pAVA393 kloniert wurde. Für ein eventuelles Splicen notwendige Sequenzinformationen waren auf diesem Genkonstrukt somit nicht vorhanden. Zwischen Transkriptionsstart und Startcodon des At-PHR1-Gens (Sakamoto *et al.*, 1998) gibt es drei weitere ATG-Codone, jeweils -269, -259 und -188 bp stromaufwärts des Startcodons. Die beiden ATGs an den Positionen -269 und -188 bp führen bereits nach dem dritten und dem zweiten Codon zu einem Stopcodon. Diese Startcodone können also als möglicher Translationsbeginn für Splicevarianten ausgeschlossen werden. Das ATG an Position -259 Bp führt erst mit dem 23. Codon in ein Stopcodon. Translatiert und fusioniert man diesen Bereich *in silico* N-Terminal mit dem At-PHR1-Protein kann die sich ergebene Proteinsequenz *in silico* mit dem Programm TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>; Version1.1) auf eine mögliche Lokalisation in den Organellen geprüft werden. Dies ergibt, dass auch diese hypothetische Splicevariante des At-PHR1-Proteins nicht in die Organellen transportiert werden würde, wobei die Begrenztheit einer *in silico* Analyse zu beachten ist. Die Überexpression von At-PHR1 in den in dieser Arbeit vorgestellten Ox-Linien beruht auf einer Fusion der At-PHR1-cDNA mit einem 35S-Promotortandem. Somit unterliegt es folgerichtig den gleichen oben genannten Limitationen für ein alternatives Splicen wie das pAVA393 At-PHR1::GFP Konstrukt für die Lokalisationsstudien. Daher ist die zelluläre Lokalisation der überexprimierten CPD-

Photolyase, wie die des GFP-Fusionsproteins, auf den Zellkern beschränkt und daher kann sie auch nur dort aktiv sein. Dennoch zeigen die Ox-Linien eine deutlich verbesserte DNA-Reparatur in den Organellen (Reisbacher, 2009). Da dieser Effekt (i) von einem funktionellen *At-PHR1*-Allel abhängig ist, (ii) der Effekt verstärkt wird, wenn CPD-Photolyase überexprimiert wird und (iii) eine Lokalisation des überexprimierten Enzyms in den Organellen ausgeschlossen werden kann, muss er aus der verbesserten Reparatur des Kerngenoms resultieren. Die Möglichkeit, dass *At-PHR1* auch als Photorezeptor oder als Teil einer Signaltransduktionskette eines Blaulicht-Photorezeptors, der an der Regulation der Reparaturfaktoren beteiligt ist, dient, scheint sehr unwahrscheinlich. Nichtsdestotrotz konnte für die CPD-Photolyase aus Reis mittels Immunogold-Verfahren und zellulärer Fraktionierung mit anschließender Western Blot Analyse gezeigt werden, dass diese sowohl im Kern als auch in beiden Organellen lokalisiert ist (Takahashi *et al.*, 2011).

#### 4.2.3 Einfluss der Photolyase Überexpression auf die Akkumulation von CPDs und das Wachstum unter UV-Belastung

Unter UV-Bestrahlung zeigen die Photolyase-überexprimierenden Linien im Vergleich zu Wildtyp Pflanzen eine deutlich reduzierte Akkumulation von CPDs. Für die CPD-Photolyase Nullmutante *uvr2-1* trifft Gegenteiliges zu (Abbildung 3.8). Die Lichtqualität der Bestrahlung wurde so gewählt, dass sie zeitgleich die Bildung und die Reparatur von CPDs erlaubt. Die gemessenen CPD-Level entstehen also aus einem Gleichgewicht, welches sich aus der für alle Linien gleichen Bildungsrate der CPDs und der, von der Photolyaseexpression der Linien abhängigen, unterschiedlichen Reparaturrate ergibt. Da das Enzym unter diesen experimentellen Bedingungen vermutlich nicht mit saturierten, oder wenigstens konstanten Substratmengen arbeitet, können keine quantitativen Aussagen getroffen werden. Jedoch simuliert dieses Experiment die natürlichen Bedingungen einer im Freiland unter polychromatischem Licht lebenden Pflanze besser, als ein Experiment mit sequenzieller Bestrahlung, welche Schädigung und Reparatur trennt.

Die Photolyase-überexprimierenden Linien zeigen unter UV-Stress eine geringere Wachstumsinhibition als Wildtyp Pflanzen. Dies kann an dem verringerten fluenzabhängigen Frischgewichtsverlust abgelesen werden. Ohne UV-Belastung entwickeln sich die Photolyase-überexprimierenden Linien nicht unterscheidbar zum Wildtyp. Die erhöhte DNA-Reparatur durch die Photolyase wirkt also dem negativen Einfluss vom UV auf das Wachstum entgegen, ohne einen erkennbaren negativen Einfluss auf das Wachstum der Pflanzen zu haben. Da die Wachstumsinhibition von Wildtyp Pflanzen in dem in Abbildung 3.9 gezeigten Experiment bereits deutlich in der Saturierung liegt, können eigentlich keine quantitativen Aussagen zum Schutz der Pflanzen durch Photolyase-Überexpression gemacht werden. Jedoch kann versucht werden, den relativen Frischgewichtsverlust in Abhängigkeit von der UV-Belastung zwischen den ersten beiden Datenpunkten der Wildtyp Pflanzen abzuschätzen. Das Fehlen zumindest eines weiteren Datenpunktes, der die Linearität des Kurvenverlaufs in diesem Datenbereich zeigen würde, schränkt die Aussagekraft dieser Schätzung aber ein. Läge der zweite Datenpunkt bereits in der Saturierung, würde die Abschätzung jedoch zu gering und nicht zu hoch ausfallen. Der Frischgewichtsverlust der Wildtyp Pflanzen zwischen den ersten beiden Datenpunkten beträgt  $47\% (\text{kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1})^{-1}$  der für die *At-PHR1* überexprimierenden Linien, über den gesamten Datenbereich gemessen,  $25\% (\text{kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1})^{-1}$ . Somit führt die Überexpression von *At-PHR1* in *Arabidopsis thaliana* unter den gegebenen experimentellen Bedingungen zu einer Halbierung des Frischgewichtsverlustes durch UV-Bestrahlung. Hidema *et al.* (2007) kommen bei Analyse der Überexpression von CPD-Photolyase in Reis zu

vergleichbaren Resultaten. Die Quantität dieses Effekts zu beurteilen, ist schwierig. Einerseits scheint eine Reduktion des negativen Einflusses von UV auf das Wachstum um den Faktor zwei nur moderat, andererseits und vor dem Hintergrund, dass UV nahezu alle Biomoleküle schädigt und die CPD-Photolyase nur einen von vielen DNA-Schäden repariert, doch bemerkenswert.

Für die Grundlagen- und die angewandte Forschung scheinen die in dieser Arbeit vorgestellten Photolyase-Überexpressionslinien von großem Interesse. Mit Hilfe dieser Linien könnten die biologischen Folgen einer erhöhten CPD-Akkumulation im Kerngenom erforscht werden. Ohne diese Linien muss versucht werden, die hierfür nötigen unterschiedlichen CPD-Mengen im Kerngenom durch unterschiedliche Intensitäten der UV-Bestrahlung zu erzeugen. Dies führt jedoch dazu, dass nicht nur die Menge der CPDs, sondern auch die Menge aller UV-abhängig erzeugten Schäden verändert wird. Die Beurteilung der biologischen Konsequenzen eines einzelnen Schadens, wie den CPDs zum Beispiel, wird hierdurch aber unmöglich. Da die Photolyase Überexpression nicht direkt vor UV-Schäden schützt, sondern nur die CPD-Akkumulationsrate durch ihre CPD-spezifische Reparaturaktivität reduziert, ist es so möglich durch die unterschiedlichen Photolyase Expressionsstärken bei konstanter UV-Belastung Kerngenome zu erzeugen, die unterschiedliche Mengen an CPDs enthalten. Die Bildung weiterer UV-Schäden bleibt hier unverändert. So können die Auswirkungen von CPDs, einem der häufigsten UV-Schäden, auf den gesamten pflanzlichen Organismus und seine Gesundheit untersucht werden. Weiter oben (s. Kap. 4.2.2) wurde bereits diskutiert, dass die Überexpression der kernlokalisierten *At-PHR1* einen positiven Effekt auf die Organellengenome hat und dass dies vermutlich auf der besseren Transkribierbarkeit des Kerngenoms basiert, und somit die Anpassung der DNA-Reparatursysteme der Organellen an diese gestiegenen Anforderungen erleichtert. Die *At-PHR1* überexprimierenden Linien zeigen unter UV-Stress ein signifikant erhöhtes Frischgewicht. Dennoch kommt es zu keiner signifikanten Erhöhung der Rosettendurchmesser. Die Blattanatomie der *At-PHR1* überexprimierenden Linien unterscheidet sich also unter UV-Stress von der der Wildtyp Pflanzen. Entweder ändert sich die Blattform oder der Blattquerschnitt. Beides sind bekannte Anpassungen an UV-Stress und in beiden Fällen scheint die Überexpression von *At-PHR1* einen positiven Effekt auf die Anpassungsleistungen der Pflanze zu haben. Dies wirft ein neues Licht auf die biologische Funktion von Photolyasen. Sie könnten nicht nur die UV-abhängige Mutationsrate reduzieren und einen Arrest des Zellzyklus vermeiden. Da CPDs die Transkription blockieren und die Bindungsstärken von Transkriptionsfaktoren an ihre *cis*-Elemente verändern (Kap. 1.1.2.1.2), helfen sie auch, das Kerngenom in einem transkribierbaren und regulierbaren Zustand zu halten. Hiermit würden sie den Organismus bei der Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen oder bei Regenerationsleistungen unterstützen, da diese besonders große Änderungen am Transkriptom erfordern. Dies müsste jedoch durch weitere Experimente untersucht werden. So könnte man Anpassungs- und Reparaturleistungen bei sich ändernden Umweltbedingungen von Pflanzen mit unterschiedlichen Photolyase-Expressionsleveln, wie der *uvr2-1* Mutante, Wildtyp Pflanzen und den *At-PHR1* überexprimierenden Linien, bei steigender UV-Belastung untersuchen. Dies könnte auf allen Ebenen des pflanzlichen Organismus erfolgen. So könnte man durch qRT-PCR oder *microarray* Analysen Veränderungen im Transkriptom untersuchen. Die kerncodierten Reparaturfaktoren für die Organellengenome scheinen hier ein besonders geeignetes Ziel, da bereits bekannt ist, dass die Erhöhung der *At-PHR1*-Expression einen positiven Einfluss auf ihre Reparaturleistung bei UV-Belastung hat. Es könnten aber auch systemische Anpassungs- und Regenerationsleistungen wie die lichtabhängige Induktion der

Flavonoidbiosynthese, die Chlorophyllregeneration nach UV- oder Starklichtbelastung oder die Deetiolierung bei UV-Stress untersucht werden.

Interessant wäre sicherlich auch, den positiven Effekt der *At-PHR1* Überexpression unter realem oder simuliertem Sonnenlicht zu untersuchen. Dies könnte auch zeigen, ob dieses System die Möglichkeit böte, Nutzpflanzen vor dem natürlich vorkommenden UV des Sonnenlichtes zu schützen und so die Produktivität der Pflanzen unter UV-Stress zu verbessern. Die *Arabidopsis* Mutante *uvi1*, welche eine verbesserte CPD und (6-4)PP Reparatur zeigt, scheint, auch wenn die experimentellen Bedingungen in beiden Studien nur schwer zu vergleichen sind, eine noch geringere Wachstumsinhibition zu zeigen als die hier untersuchten Photolyase-Überexpressionslinien. Placentalia haben weder (6-4)- noch CPD Photolyasen und können DNA Schäden einzig mit ihren lichtunabhängigen Reparatursystemen entfernen. Transgene Mäuse, die CPD-, (6-4)- oder beide Photolyasen exprimieren, zeigen durch die verbesserte Reparatur von Pyrimidindimeren stark reduzierte Stressantworten und Mutationsinduktion unter UV-Bestrahlung. Auch hier zeigt sich, dass die Coexpression von beiden Photolyasen den besten UV-Schutz gewährt (Schul *et al.*, 2002; Jans *et al.*, 2005). Der Ansatz, dem UV-Stress durch verbesserte DNA-Reparatur entgegenzuwirken, ist also auch bei Tieren erfolgreich, was auch die Experimente mit photolyasehaltiger Sonnencreme zeigen (Stege *et al.*, 2000). Die zusätzliche Überexpression von *At-UVR3* in den bereits *At-PHR1* überexprimierenden Linien könnte den Schutz der Pflanzen vor UV-Stress weiter verbessern. Am Ende könnte ein System stehen, welches durch die Überexpression von nur einem oder zwei Genen Nutzpflanzen effektiv vor UV-Schäden schützt. Bei Übertragung auf Kulturpflanzen könnte dies den negativen Auswirkungen des Ozonlochs auf die Agrarproduktion entgegenwirken.



## 5 Zusammenfassung

CPD-Photolyasen sind Enzyme, die lichtabhängig Cyclobutanpyrimidindimer (CPD), eines der Hauptprodukte der UV-abhängigen DNA-Schädigung, reparieren. Sie können bei fast allen Lebewesen gefunden werden und spielen eine zentrale Rolle bei der UV-Resistenz dieser Organismen. Als monomeres, fehlerfrei und energieneutral arbeitendes Reparatursystem sind sie ein geeignetes Werkzeug für die biotechnologische Verbesserung der UV-Toleranz. So könnten sie helfen, den negativen Folgen der erhöhten UV-Belastung, die durch das Ozonloch entstehen, entgegen zu wirken.

In *Escherichia coli* rekombinant überexprimiert bindet die CPD-Photolyase aus *Thermus thermophilus* FMN als zweiten Kofaktor. Im Gegensatz hierzu binden die meisten anderen diesbezüglich analysierten Photolyasen Methenyltetrahydrofolat oder Deazaflavin als zweiten Kofaktor. In dieser Arbeit wird durch Absorptions- und Wirkungsspektroskopie gezeigt, dass FMN als Antennenchromophor fungiert und die absorbierte Lichtenergie auf den katalytisch aktiven FAD-Kofaktor überträgt. Hierdurch wird die Photoreduktion und Enzymaktivität der *Thermus thermophilus* Photolyase deutlich verbessert.

Als sessile und photoautotrophe Organismen sind Pflanzen in besonderem Maße UV- und Lichtstress ausgesetzt. Sie besitzen hochkomplexe Signal- und Schutzmechanismen, um sich optimal an die an ihrem Standort vorherrschenden Lichtbedingungen anzupassen. Bei der UV-Toleranz von Pflanzen spielen CPD-Photolyasen eine zentrale Rolle. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die gezielte Verbesserung der Reparatur von CPD-Schäden durch die Überexpression der Arabidopsis CPD-Photolyase in *Arabidopsis thaliana* einen positiven Effekt auf die UV-Toleranz der Pflanzen hat. Hierfür wurde der kodierende Bereich des CPD-Photolyasegens (*At-PHR1*) mit dem starken und konstitutiven 35S CaMV Promotor fusioniert und *Arabidopsis* stabil mit dem resultierenden Konstrukt transformiert. Die stabile Integration des Transgens in das Genom wurde durch Southern Blot überprüft und zudem die Anzahl der T-DNA-Insertionen bestimmt. Die Überexpression wurde dann auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene bestimmt. Es konnten deutlich erhöhte Transkript- und Proteinmengen von CPD-Photolyase in den transgenen Linien nachgewiesen werden. Um den Einfluss der *At-PHR1*-Überexpression auf die Reparatur von CPD-Schäden zu untersuchen, wurden Rosettenblätter mit UV-B und UV-A reichem Licht bestrahlt und die CPD-Akkumulationsrate bestimmt. Hierbei zeigte sich eine deutlich verringerte Akkumulation von CPDs in den transgenen Linien. Weiterhin wurde untersucht, wie sich die Reduktion der CPD-Akkumulation auf das Wachstum der Pflanzen auswirkt. Hierzu wurde das Frischgewicht und der Rosettendurchmesser der unter UV-Stress angezogen Pflanzen bestimmt. Hierbei zeigen die Photolyase-überexprimierenden Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber UV-B.

In der Literatur gibt es widersprüchliche Angaben zur zellulären Lokalisation von CPD-Photolyasen in Pflanzen. Durch Konfokale Laser Scanning Mikroskopie von *Arabidopsis* Protoplasten, die ein *At-PHR1::GFP* Fusionsprotein exprimierten, wird hier gezeigt, dass die zelluläre Lokalisation von *At-PHR1* auf den Zellkern beschränkt ist.

## 6 Dank

Zuerst möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Bekannten für ihre fortwährende Unterstützung und Hilfe in allen Lebenslagen bedanken.

Bei Frau Dr. Anne-Kathrin Hendrich und Frau Prof. Dr. Gabriele Klug möchte ich mich für die angenehme und produktive Zusammenarbeit am CRY B-Protein bedanken.

Den Herren Dr. Erik Schleicher und Dr. Chris Kay und Herrn Prof. Dr. Stefan Weber möchte ich für die tolle Zusammenarbeit bei den EPR-Messungen und den Untersuchungen zum Photocyclus von Klasse II CPD-Photolyasen danken.

Herr Dr. Franz Grolig war mir bei den Arbeiten mit dem KLSM eine große Hilfe und hat mir darüber hinaus die vielen Fragen, die ich nicht nur zur Lichtmikroskopie hatte, stets mit großer Kompetenz beantwortet.

Frau Dr. Annette Kohnen möchte ich für die Durchsicht des Manuskriptes dieser Arbeit und ihre Anmerkungen hierzu danken.

Herr Dr. Tobias Klar und Herr Prof. Dr. Lars Oliver Essen haben nicht nur großen Anteil an den Arbeiten zur Tt-PHR, sondern haben mich auch bei der Reinigung und den Kristallisationsversuchen von At-PHR1 unterstützt. Der kooperativen Arbeitsweise von ihnen aber auch von Frau Petra Gnau sind nicht nur die guten Resultate unserer gemeinsamen Arbeit geschuldet, sondern auch, dass ich mich am Fachbereich Chemie heimisch gefühlt habe.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Batschauer möchte ich für die schöne gemeinsame Zeit und das gute Arbeitsklima in der Arbeitsgruppe danken. Besonders möchte ich Frau Oxana Groß, Frau Elvira Happel und Frau Agnes Damm für ihre Unterstützung beim experimentellen Arbeiten und der Kulturhaltung danken. Bei Frau Gesa Rosenfeldt möchte ich mich für die gemeinsame Zeit in unserem Labor und bei Herrn Dr. Stefan Reibacher für die vielen gemeinsamen Mittagessen und die damit verbundenen Beratungen bedanken. Bei Herrn Dr. Richard Pokorny und Herrn PD Dr. Dieter Dörnemann konnte ich stets kompetenten Rat einholen, was mir eine große Hilfe war.

Vor allem aber möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer bedanken. Er hat durch seine fachliche und menschliche Kompetenz meine Entwicklung als Wissenschaftler aber auch als Person in den letzten Jahren entscheidend gefördert und geprägt.

## **7 Lebenslauf**

Die Seiten 91-92 (Lebenslauf) enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.



## 8 Verzeichnisse

### Abkürzungsverzeichnis

<b>(6-4)PP</b>	6-4 Photoprodukt
<b>8-HDF</b>	8-Hydroxy-5-Deazaflavin
<b>8-oxoG</b>	8-oxo-7,8-Dihydroguanin
<b>A</b>	Adenin
<b>Å</b>	Angström ( $10^{-10}$ m)
<b>AMP</b>	Adenosinmonophosphat
<b>AP</b>	Alkalische Phosphatase
<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b>BER</b>	Basenexzisionsreparatur
<b>BSA</b>	Rinder Serum Albumin
<b>C</b>	Cytosin
<b>CHS</b>	Chalconsynthase
<b>CPD</b>	Cyclobutanpyrimidindimer
<b>CTAB</b>	Cetyltrimethylammoniumbromid
<b>CV</b>	Säulenvolumen
<b>DAB</b>	Deutsches Arzneibuch
<b>DIG</b>	Digoxigenin
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DNase</b>	Desoxyribonuklease
<b>dsDNA</b>	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EB</b>	10 mM Tris/HCl, pH 8,0

<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>ELISA</b>	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
<b>FAD</b>	Flavin Adenosin Dinukleotid
<b>FCKW</b>	Fluorchlorkohlenwasserstoffe
<b>FMN</b>	Flavin-Mononukleotid
<b>FPLC</b>	Fast Protein Liquid Chromatography
<b>G</b>	Guanin
<b>GFP</b>	Green Fluorescent P rotein
<b>GGR</b>	Globaler Genom Reparatur
<b>h</b>	Stunde
<b>HPLC</b>	High Pressure/Performance Liquid Chromatography
<b>HR</b>	Homologe Rekombination
<b>HRP</b>	Meerrettich Peroxidase
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
<b>MES</b>	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
<b>min</b>	Minute
<b>MS</b>	Murashige und Skoog Medium
<b>MTHF</b>	5,10- Methenyltetrahydrofolat
<b>NAA</b>	1-Naphthylessigsäure
<b>NER</b>	Nukleotidexzisionsreparatur
<b>NHEJ</b>	Nicht homologes End Joining
<b>NLS</b>	Kern Lokalisations Signal
<b>ODP</b>	<i>o</i> -Phenylendiamin
<b>PAR</b>	Photosynthetisch Aktive Strahlung
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>RT</b>	Raumtemperatur

<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>ssDNA</b>	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
<b>T</b>	Thymin
<b>TAIR</b>	The Arabidopsis Information Resource
<b>TCR</b>	Transkriptions gekoppelter Reparatur
<b>TE</b>	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA
<b>TEMED</b>	Tetramethylethyldiamin
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>U</b>	Unit
<b>ÜN</b>	über Nacht

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Entstehung von ROS durch die Radiolyse von Wasser .....	1
Abbildung 1.2 Fenton-Reaktion .....	2
Abbildung 1.3 8-Oxoguanin.....	2
Abbildung 1.4 Direkte DNA-Schäden .....	3
Abbildung 1.5 Pyrimidindimere .....	4
Abbildung 1.6 Räumliche Strukturen der Pyrimidindimere .....	6
Abbildung 1.7 Stammbaum der Photolyase Cryptochrom Familie.....	10
Abbildung 1.8 Die verschiedenen Redoxzustände von FAD .....	11
Abbildung 1.9 Absorption der verschiedenen Flavin Species in Abhängigkeit der Wellenlänge .....	12
Abbildung 1.10 Reaktionsmechanismus von CPD Photolyasen .....	15
Abbildung 1.11 Antennenpigmente von Photolyasen .....	16
Abbildung 2.1 Redoxübergänge des Resazurins .....	63
Abbildung 2.2 Reaktionsschema für die Glukoseoxidase Katalase Reaktion .....	63
Abbildung 2.3 HRP katalysierte Kopplung von <i>o</i> -Phenylendiamin .....	65
Abbildung 3.1 Chromatogramme und Gele der At-PHR1 Reinigung .....	69
Abbildung 3.2 Chromatogramme der Flavinbestimmung von Tt-PHR WT und Tt-PHR R46E..	71
Abbildung 3.3 Differenzspektren der Photoreduktion von Tt-PHR WT und Tt-PHR R46E .....	72
Abbildung 3.4 Reparaturaktivität von WT Tt-PHR und Tt-PHR R46E .....	73
Abbildung 3.5 Analyse der Kopienzahl der T-DNA in die transgenen 35S:: <i>At-PHR1</i> -Linien ....	75
Abbildung 3.6 Expression des <i>At-PHR1</i> Gens .....	77
Abbildung 3.7 Zelluläre Lokalisation von At-PHR1 .....	78
Abbildung 3.8 Akkumulation von CPDs unter UV-Bestrahlung.....	79
Abbildung 3.9 Einfluss von UV-B auf das Pflanzenwachstum .....	80



# Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Allgemeine Laborgeräte .....	24
Tabelle 2.2 Photobiologisches Gerät.....	25
Tabelle 2.3 Verwendete Gene.....	28
Tabelle 2.4 Verwendete Oligonukleotide .....	29
Tabelle 2.5 Lösungen für die <i>E. coli</i> Kultur .....	31
Tabelle 2.6 Kulturmedium für autotrophe <i>Arabidopsis</i> Zellkultur .....	32
Tabelle 2.7 Lösungen für die Miniprep .....	33
Tabelle 2.8 Lösungen für die elektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren.....	35
Tabelle 2.9 Lösungen für das Kompetentmachen von <i>E. coli</i> .....	37
Tabelle 2.10 Lösungen für die Expression von rekombinantem Protein in <i>E. coli</i> .....	38
Tabelle 2.11 Pipettierschemata für die PCR.....	39
Tabelle 2.12 Temperaturprogramm für die PCR.....	40
Tabelle 2.13 Pipettierschema für die A-Addition .....	40
Tabelle 2.14 Master Mix für die Reverse Transkription .....	42
Tabelle 2.15 Pipettierschema für den Realtime PCR Master Mix.....	43
Tabelle 2.16 Temperaturprogramm für die Realtime PCR.....	43
Tabelle 2.17 Lösungen für die Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> Protoplasten .....	45
Tabelle 2.18 Lösungen für die Isolation von gesamt DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> Blättern.	45
Tabelle 2.19 Lösungen für den Southern Blot.....	48
Tabelle 2.20 Lösungen für die Amidoschwarz Proteinbestimmung .....	49
Tabelle 2.21 Extraktionspuffer für die Proteinextraktion aus <i>A. thaliana</i> .....	50
Tabelle 2.22 Pipettierschema für Lämmli Gele .....	51
Tabelle 2.23 Pipettierschema für Schäggergele.....	52
Tabelle 2.24 Lösungen für die SDS-PAGE .....	53
Tabelle 2.25 Lösungen für die Western Blot Analyse .....	55
Tabelle 2.26 Puffer für die Proteinreinigung.....	59
Tabelle 2.27 Lösungen für die Antigen spezifische Affinitätschromatografie .....	61
Tabelle 2.28 Lösungen für die Identifikation und Quantifizierung von Flavinen.....	61
Tabelle 2.29 Lösungen zur Herstellung von CPD haltiger DNA .....	62
Tabelle 2.30 Lösungen für den <i>in vitro</i> Enzymtest von CPD Photolyasen.....	64
Tabelle 2.31 Lösungen für die Messung der CPD-Photolyase Reparaturaktivität <i>in planta</i> ....	64
Tabelle 2.32 Lösungen für die Analyse des relativen CPD Gehaltes durch ELISA .....	66

# Literaturverzeichnis

**Ahmad M., Jarillo J. A., Klimczak L. J., Landry L. G., Peng T., Last R. L. und Cashmore A. R.** (1997) "An enzyme similar to animal type II photolyases mediates photoreactivation in Arabidopsis." *Plant Cell* **9**(2): 199-207.

**Al-Sady B., Ni W., Kircher S., Schafer E. und Quail P. H.** (2006) "Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation." *Mol Cell* **23**(3): 439-46.

**Al Khateeb W. M. und Schroeder D. F.** (2007) "DDB2, DDB1A and DET1 exhibit complex interactions during Arabidopsis development." *Genetics* **176**(1): 231-42.

**Al Khateeb W. M. und Schroeder D. F.** (2009) "Overexpression of Arabidopsis damaged DNA binding protein 1A (DDB1A) enhances UV tolerance." *Plant Mol Biol* **70**(4): 371-83.

**Ang L. H., Chattopadhyay S., Wei N., Oyama T., Okada K., Batschauer A. und Deng X. W.** (1998) "Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of Arabidopsis development." *Mol Cell* **1**(2): 213-22.

**Aubert C., Mathis P., Eker A. P. und Brettel K.** (1999) "Intraprotein electron transfer between tyrosine and tryptophan in DNA photolyase from *Anacystis nidulans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(10): 5423-7.

**Balestrazzi A., Confalonieri M., Macovei A., Dona M. und Carbonera D.** (2011) "Genotoxic stress and DNA repair in plants: emerging functions and tools for improving crop productivity." *Plant Cell Rep* **30**(3): 287-95.

**Banerjee S. K., Christensen R. B., Lawrence C. W. und LeClerc J. E.** (1988) "Frequency and spectrum of mutations produced by a single cis-syn thymine-thymine cyclobutane dimer in a single-stranded vector." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(21): 8141-5.

**Begley T. P.** (1994) "Photoenzymes: A Novel Class of Biological Catalysts." *Accounts of Chemical Research* **27**(12): 394-401.

**Beukers R. und Berends W.** (1960) "Isolation and identification of the irradiation product of thymine." *Biochim Biophys Acta* **41**: 550-1.

**Bieza K. und Lois R.** (2001) "An Arabidopsis mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics." *Plant Physiol* **126**(3): 1105-15.

**Birnboim H. C.** (1983) "A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA." *Methods Enzymol* **100**: 243-55.

**Birnboim H. C. und Doly J.** (1979) "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-23.

**Biskup T., Schleicher E., Okafuji A., Link G., Hitomi K., Getzoff E. D. und Weber S.** (2009) "Direct observation of a photoinduced radical pair in a cryptochrome blue-light photoreceptor." *Angew Chem Int Ed Engl* **48**(2): 404-7.

**Bjelland S. und Seeberg E.** (2003) "Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation." *Mutat Res* **531**(1-2): 37-80.

**Bjerrum J. B. und Schäfer-Nilsen C.** (1986) "Buffer systems and transfer parameters for semidry electroblotting with a horizontal apparatus " *In: Electrophoresis '86*. Ed.: Dunn M. J. VCH (Weinheim ): 315-327.

**Blake C. C., Koenig D. F., Mair G. A., North A. C., Phillips D. C. und Sarma V. R.** (1965) "Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution." *Nature* **206**(986): 757-61.

**Boorstein R. J., Hilbert T. P., Cunningham R. P. und Teebor G. W.** (1990) "Formation and stability of repairable pyrimidine photohydrates in DNA." *Biochemistry* **29**(46): 10455-60.

**Bourre F., Renault G. und Sarasin A.** (1987) "Sequence effect on alkali-sensitive sites in UV-irradiated SV40 DNA." *Nucleic Acids Res* **15**(21): 8861-75.

**Bradford M. M.** (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.

**Brash D. E. und Haseltine W. A.** (1982) "UV-induced mutation hotspots occur at DNA damage hotspots." *Nature* **298**(5870): 189-92.

**Breen A. P. und Murphy J. A.** (1995) "Reactions of oxyl radicals with DNA." *Free Radic Biol Med* **18**(6): 1033-77.

**Brown B. A., Cloix C., Jiang G. H., Kaiserli E., Herzyk P., Kliebenstein D. J. und Jenkins G. I.** (2005) "A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(50): 18225-30.

**Brudler R., Hitomi K., Daiyasu H., Toh H., Kucho K., Ishiura M., Kanehisa M., Roberts V. A., Todo T., Tainer J. A. und Getzoff E. D.** (2003) "Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution." *Mol Cell* **11**(1): 59-67.

**Cadet J., Sage E. und Douki T.** (2005) "Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA." *Mutat Res* **571**(1-2): 3-17.

**Caldwell M. M., Bornman J. F., Ballare C. L., Flint S. D. und Kulandaivelu G.** (2007) "Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors." *Photochem Photobiol Sci* **6**(3): 252-66.

**Cannon G. C., Hedrick L. A. und Heinhorst S.** (1995) "Repair mechanisms of UV-induced DNA damage in soybean chloroplasts." *Plant Mol Biol* **29**(6): 1267-77.

**Castells E., Molinier J., Benvenuto G., Bourbousse C., Zabulon G., Zalc A., Cazzaniga S., Genschik P., Barneche F. und Bowler C.** (2011) "The conserved factor DE-ETIOLATED 1 cooperates with CUL4-DDB1DDB2 to maintain genome integrity upon UV stress." *EMBO J* **30**(6): 1162-72.

**Castells E., Molinier J., Drevensek S., Genschik P., Barneche F. und Bowler C.** (2010) "det1-1-induced UV-C hyposensitivity through UVR3 and PHR1 photolyase gene over-expression." *Plant J* **63**(3): 392-404.

**Chattopadhyay S., Ang L. H., Puente P., Deng X. W. und Wei N.** (1998) "Arabidopsis bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression." *Plant Cell* **10**(5): 673-83.

**Chory J. und Peto C. A.** (1990) "Mutations in the DET1 gene affect cell-type-specific expression of light-regulated genes and chloroplast development in Arabidopsis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(22): 8776-80.

**Christie J. M.** (2007) "Phototropin blue-light receptors." *Annu Rev Plant Biol* **58**: 21-45.

**Cockell C. S. und Knowland J.** (1999) "Ultraviolet radiation screening compounds." *Biol Rev Camb Philos Soc* **74**(3): 311-45.

**Cohen S. N., Chang A. C., Boyer H. W. und Helling R. B.** (1973) "Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(11): 3240-4.

**Compton S. J. und Jones C. G.** (1985) "Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay." *Anal Biochem* **151**(2): 369-74.

**Demarsy E. und Fankhauser C.** (2009) "Higher plants use LOV to perceive blue light." *Curr Opin Plant Biol* **12**(1): 69-74.

**Donahue B. A., Yin S., Taylor J. S., Reines D. und Hanawalt P. C.** (1994) "Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(18): 8502-6.

**Draper C. K. und Hays J. B.** (2000) "Replication of chloroplast, mitochondrial and nuclear DNA during growth of unirradiated and UVB-irradiated Arabidopsis leaves." *Plant J* **23**(2): 255-65.

**Drewnowski A. und Gomez-Carneros C.** (2000) "Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review." *Am J Clin Nutr* **72**(6): 1424-35.

**Dulbecco R.** (1949) "Reactivation of ultra-violet-inactivated bacteriophage by visible light." *Nature* **163**(4155): 949.

**Duncan J., Hamilton L. und Friedberg E. C.** (1976) "Enzymatic degradation of uracil-containing DNA. II. Evidence for N-glycosidase and nuclease activities in unfractionated extracts of *Bacillus subtilis*." *J Virol* **19**(2): 338-45.

**Eisen J. A. und Hanawalt P. C.** (1999) "A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes." *Mutat Res* **435**(3): 171-213.

**Eker A. P., Kooiman P., Hessels J. K. und Yasui A.** (1990) "DNA photoreactivating enzyme from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*." *J Biol Chem* **265**(14): 8009-15.

**Faktor O., Loake G., Dixon R. A. und Lamb C. J.** (1997) "The G-box and H-box in a 39 bp region of a French bean chalcone synthase promoter constitute a tissue-specific regulatory element." *The Plant Journal* **11**(5): 1105-1113.

**Fang R. X., Nagy F., Sivasubramaniam S. und Chua N. H.** (1989) "Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants." *Plant Cell* **1**(1): 141-50.

**Farman J. C., Gardiner B. G. und Shanklin J. D.** (1985) "Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO<sub>x</sub>/NO<sub>x</sub> interaction." *Nature* **315**(6016): 207-210.

**Favory J. J., Stec A., Gruber H., Rizzini L., Oravecz A., Funk M., Albert A., Cloix C., Jenkins G. I., Oakeley E. J., Seidlitz H. K., Nagy F. und Ulm R.** (2009) "Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in Arabidopsis." *EMBO J* **28**(5): 591-601.

**Fenton H. J. H.** (1894) "Oxidation of tartaric acid in presence of iron." *J Chem Soc, Trans* **65**: 899-905.

**Fornace A. J., Jr. und Kohn K. W.** (1976) "DNA-protein cross-linking by ultraviolet radiation in normal human and xeroderma pigmentosum fibroblasts." *Biochim Biophys Acta* **435**(1): 95-103.

**Franklin K. A. und Quail P. H.** (2010) "Phytochrome functions in Arabidopsis development." *J Exp Bot* **61**(1): 11-24.

**Franklin W. A., Doetsch P. W. und Haseltine W. A.** (1985) "Structural determination of the ultraviolet light-induced thymine-cytosine pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct." *Nucleic Acids Res* **13**(14): 5317-25.

**Friedberg E. C., Walker G. C., Siede W., Wood R. D., Schultz R. A. und Ellenberger E.** (2006) "DNA Repair and Mutagenesis" 2. ed. Aufl. ASM Press, (Washington D.C.).

**Fujihashi M., Numoto N., Kobayashi Y., Mizushima A., Tsujimura M., Nakamura A., Kawarabayashi Y. und Miki K.** (2007) "Crystal structure of archaeal photolyase from *Sulfolobus tokodaii* with two FAD molecules: implication of a novel light-harvesting cofactor." *J Mol Biol* **365**(4): 903-10.

**Glickman B. W., Schaaper R. M., Haseltine W. A., Dunn R. L. und Brash D. E.** (1986) "The C-C (6-4) UV photoproduct is mutagenic in *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(18): 6945-9.

**Görner H.** (1994) "Photochemistry of DNA and related biomolecules: quantum yields and consequences of photoionization." *J Photochem Photobiol B* **26**(2): 117-39.

**Gritz L. und Davies J.** (1983) "Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*." *Gene* **25**(2-3): 179-88.

**Hackett P. B. und Sauerbier W.** (1974) "Radiological mapping of the ribosomal RNA transcription unit in *E. coli*." *Nature* **251**(5476): 639-41.

**Hada M., Hino K., Buchholz G., Goss J., Wellmann E. und Shin M.** (2000a) "Assay of DNA photolyase activity in spinach leaves in relation to cell compartmentation-evidence for lack of DNA photolyase in chloroplasts." *Biosci Biotechnol Biochem* **64**(6): 1288-91.

**Hada M., Iida Y. und Takeuchi Y.** (2000b) "Action spectra of DNA photolyases for photorepair of cyclobutane pyrimidine dimers in sorghum and cucumber." *Plant Cell Physiol* **41**(5): 644-8.

**Hardy P. M.** (1985) "The Protein Amino Acids" *In*: Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids. Ed.: Barrett G. C. Chapman and Hall, (London, New York).

**Harlow E. und Lane D.** (1999) "Using antibodies : a laboratory manual" 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, (Cold Spring Harbor, NY).

**Hartman R. F. und Rose S. D.** (1992) "Efficient photosensitized pyrimidine dimer splitting by a reduced flavin requires the deprotonated flavin." *Journal of the American Chemical Society* **114**(9): 3559-3560.

**Haseltine W. A., Gordon L. K., Lindan C. P., Grafstrom R. H., Shaper N. L. und Grossman L.** (1980) "Cleavage of pyrimidine dimers in specific DNA sequences by a pyrimidine dimer DNA-glycosylase of *M. luteus*." *Nature* **285**(5767): 634-41.

**Hays J. B.** (2002) "Arabidopsis thaliana, a versatile model system for study of eukaryotic genome-maintenance functions." *DNA Repair (Amst)* **1**(8): 579-600.

**Henle E. S. und Linn S.** (1997) "Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide." *J Biol Chem* **272**(31): 19095-8.

**Hidema J., Taguchi T., Ono T., Teranishi M., Yamamoto K. und Kumagai T.** (2007) "Increase in CPD photolyase activity functions effectively to prevent growth inhibition caused by UVB radiation." *Plant J* **50**(1): 70-9.

**Holdeman L. V. und Chen J.-S.** (1977) "Anaerobe laboratory manual" 4. Aufl. Anaerobe Lab., Virginia Polytechnic Institute and State Univ., (Blacksburg, VA, USA).

**Holmes M. G. und Keiller D. R.** (2002) "Effects of pubescence and waxes on the reflectance of leaves in the ultraviolet and photosynthetic wavebands: a comparison of a range of species." *Plant, Cell & Environment* **25**(1): 85-93.

**Huang Y., Baxter R., Smith B. S., Partch C. L., Colbert C. L. und Deisenhofer J.** (2006) "Crystal structure of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana* and its implications for photolyase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(47): 17701-6.

**Iida K., Fukami-Kobayashi K., Toyoda A., Sakaki Y., Kobayashi M., Seki M. und Shinozaki K.** (2009) "Analysis of multiple occurrences of alternative splicing events in *Arabidopsis thaliana* using novel sequenced full-length cDNAs." *DNA Res* **16**(3): 155-64.

**Islam S. D. M., Susdorf T., Penzkofer A. und Hegemann P.** (2003) "Fluorescence quenching of flavin adenine dinucleotide in aqueous solution by pH dependent isomerisation and photo-induced electron transfer." *Chemical Physics* **295**(2): 137-149.

**Jans J., Schul W., Sert Y. G., Rijksen Y., Rebel H., Eker A. P., Nakajima S., van Steeg H., de Gruijl F. R., Yasui A., Hoeijmakers J. H. und van der Horst G. T.** (2005) "Powerful skin cancer protection by a CPD-photolyase transgene." *Curr Biol* **15**(2): 105-15.

**Jansen M. A. K.** (2002) "Ultraviolet-B radiation effects on plants: induction of morphogenic responses." *Physiologia Plantarum* **116**(3): 423-429.

**Jenkins G. I.** (2009) "Signal transduction in responses to UV-B radiation." *Annu Rev Plant Biol* **60**: 407-31.

**Jiang C. Z., Yee J., Mitchell D. L. und Britt A. B.** (1997a) "Photorepair mutants of *Arabidopsis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14): 7441-5.

**Jiang C. Z., Yen C. N., Cronin K., Mitchell D. und Britt A. B.** (1997b) "UV- and gamma-radiation sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*." *Genetics* **147**(3): 1401-9.

**Jiao Y., Lau O. S. und Deng X. W.** (2007) "Light-regulated transcriptional networks in higher plants." *Nat Rev Genet* **8**(3): 217-30.



**Jin H., Cominelli E., Bailey P., Parr A., Mehrstens F., Jones J., Tonelli C., Weisshaar B. und Martin C.** (2000) "Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in Arabidopsis." *EMBO J* **19**(22): 6150-61.

**Johnson L. N. und Phillips D. C.** (1965) "Structure of some crystalline lysozyme-inhibitor complexes determined by X-ray analysis at 6 Angstrom resolution." *Nature* **206**(986): 761-3.

**Jorns M. S., Sancar G. B. und Sancar A.** (1984) "Identification of a neutral flavin radical and characterization of a second chromophore in Escherichia coli DNA photolyase." *Biochemistry* **23**(12): 2673-9.

**Kaiser G., Kleiner O., Beisswenger C. und Batschauer A.** (2009) "Increased DNA repair in Arabidopsis plants overexpressing CPD photolyase." *Planta* **230**: 505-15.

**Kanai S., Kikuno R., Toh H., Ryo H. und Todo T.** (1997) "Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family." *J Mol Evol* **45**(5): 535-48.

**Kasai H. und Nishimura S.** (1984) "Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents." *Nucleic Acids Res* **12**(4): 2137-45.

**Kato R., Hasegawa K., Hidaka Y., Kuramitsu S. und Hoshino T.** (1997) "Characterization of a thermostable DNA photolyase from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB27." *J Bacteriol* **179**(20): 6499-503.

**Kavakli I. H. und Sancar A.** (2004) "Analysis of the role of intraprotein electron transfer in photoreactivation by DNA photolyase in vivo." *Biochemistry* **43**(48): 15103-10.

**Kelner A.** (1949) "Effect of Visible Light on the Recovery of *Streptomyces Griseus* Conidia from Ultra-violet Irradiation Injury." *Proc Natl Acad Sci U S A* **35**(2): 73-9.

**Kerr J. B. und McElroy C. T.** (1993) "Evidence for large upward trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion." *Science* **262**(5136): 1032-4.

**Kim J. K. und Choi B. S.** (1995) "The solution structure of DNA duplex-decamer containing the (6-4) photoproduct of thymidyl(3'-->5')thymidine by NMR and relaxation matrix refinement." *Eur J Biochem* **228**(3): 849-54.

**Kim S. T., Li Y. F. und Sancar A.** (1992a) "The third chromophore of DNA photolyase: Trp-277 of Escherichia coli DNA photolyase repairs thymine dimers by direct electron transfer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(3): 900-4.

**Kim S. T. und Sancar A.** (1991) "Effect of base, pentose, and phosphodiester backbone structures on binding and repair of pyrimidine dimers by Escherichia coli DNA photolyase." *Biochemistry* **30**(35): 8623-30.

**Kim S. T., Sancar A., Essenmacher C. und Babcock G. T.** (1992b) "Evidence from photoinduced EPR for a radical intermediate during photolysis of cyclobutane thymine dimer by DNA photolyase. ." *J Am Chem Soc* **114**: 4442-43.

**Kimura S. und Sakaguchi K.** (2006) "DNA repair in plants." *Chem Rev* **106**(2): 753-66.

**Kimura S., Tahira Y., Ishibashi T., Mori Y., Mori T., Hashimoto J. und Sakaguchi K.** (2004) "DNA repair in higher plants; photoreactivation is the major DNA repair pathway in non-proliferating cells while excision repair (nucleotide excision repair and base excision repair) is active in proliferating cells." *Nucleic Acids Res* **32**(9): 2760-7.

**Kiontke S., Geisselbrecht Y., Pokorny R., Carell T., Batschauer A. und Essen L.-O.** (2011) "Crystal structures of an archeal class II DNA photolyase and its complex with UV-damaged duplex DNA." *EMBO J* **30**: 4497-49.

**Klar T., Kaiser G., Hennecke U., Carell T., Batschauer A. und Essen L. O.** (2006) "Natural and non-natural antenna chromophores in the DNA photolyase from *Thermus thermophilus*." *Chembiochem* **7**(11): 1798-806.

**Kleine T., Lockhart P. und Batschauer A.** (2003) "An Arabidopsis protein closely related to Synechocystis cryptochrome is targeted to organelles." *Plant J* **35**(1): 93-103.

**Kleiner O., Butenandt J., Carell T. und Batschauer A.** (1999) "Class II DNA photolyase from Arabidopsis thaliana contains FAD as a cofactor." *Eur J Biochem* **264**(1): 161-7.

**Kliebenstein D. J., Lim J. E., Landry L. G. und Last R. L.** (2002) "Arabidopsis UVR8 regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human regulator of chromatin condensation 1." *Plant Physiol* **130**(1): 234-43.

**Komori H., Masui R., Kuramitsu S., Yokoyama S., Shibata T., Inoue Y. und Miki K.** (2001) "Crystal structure of thermostable DNA photolyase: pyrimidine-dimer recognition mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 13560-5.

**Körner C.** (2003) "Alpine Plant Life - Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems" 2. Aufl. Springer Verlag, (Berlin).

**Kurkin V. A.** (2003) "Phenylpropanoids from Medicinal Plants: Distribution, Classification, Structural Analysis, and Biological Activity." *Chemistry of Natural Compounds* **39**(2): 123-153.

**Lämmli U. K.** (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.

**Landry L. G., Stapleton A. E., Lim J., Hoffman P., Hays J. B., Walbot V. und Last R. L.** (1997) "An Arabidopsis photolyase mutant is hypersensitive to ultraviolet-B radiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(1): 328-32.

**LeClerc J. E., Borden A. und Lawrence C. W.** (1991) "The thymine-thymine pyrimidine-pyrimidone(6-4) ultraviolet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3' thymine-to-cytosine transitions in Escherichia coli." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(21): 9685-9.

**Lee J. H., Bae S. H. und Choi B. S.** (2000) "The Dewar photoproduct of thymidyl(3'-->5')-thymidine (Dewar product) exhibits mutagenic behavior in accordance with the "A rule"." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4591-6.

**Lee J. H., Hwang G. S. und Choi B. S.** (1999) "Solution structure of a DNA decamer duplex containing the stable 3' T.G base pair of the pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproduct [(6-4) adduct]: implications for the highly specific 3' T --> C transition of the (6-4) adduct." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6632-6.

**Lindahl T.** (1976) "New class of enzymes acting on damaged DNA." *Nature* **259**(5538): 64-6.

**Liu Z., Hall J. D. und Mount D. W.** (2001) "Arabidopsis UVH3 gene is a homolog of the Saccharomyces cerevisiae RAD2 and human XPG DNA repair genes." *Plant J* **26**(3): 329-38.

**Liu Z., Hong S. W., Escobar M., Vierling E., Mitchell D. L., Mount D. W. und Hall J. D.** (2003) "Arabidopsis UVH6, a homolog of human XPD and yeast RAD3 DNA repair genes, functions in DNA repair and is essential for plant growth." *Plant Physiol* **132**(3): 1405-14.

**Liu Z., Hossain G. S., Islas-Osuna M. A., Mitchell D. L. und Mount D. W.** (2000) "Repair of UV damage in plants by nucleotide excision repair: Arabidopsis UVH1 DNA repair gene is a homolog of Saccharomyces cerevisiae Rad1." *Plant J* **21**(6): 519-28.

**Lloyd R. S.** (2005) "Investigations of pyrimidine dimer glycosylases--a paradigm for DNA base excision repair enzymology." *Mutat Res* **577**(1-2): 77-91.

**Lottspeich F. und Zorbas H.** (1998) "Bioanalytik" 1. Aufl. Spectrum Akademischer Verlag (Heidelberg; Berlin ).

**Lucas-Lledó J. I. und Lynch M.** (2009) "Evolution of mutation rates: phylogenomic analysis of the photolyase/cryptochrome family." *Mol Biol Evol* **26**(5): 1143-53.

**Ma L., Gao Y., Qu L., Chen Z., Li J., Zhao H. und Deng X. W.** (2002) "Genomic evidence for COP1 as a repressor of light-regulated gene expression and development in Arabidopsis." *Plant Cell* **14**(10): 2383-98.

**Ma L., Li J., Qu L., Hager J., Chen Z., Zhao H. und Deng X. W.** (2001) "Light control of Arabidopsis development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways." *Plant Cell* **13**(12): 2589-607.

**Maeda H., Matsu-ura S., Yamauchi Y. und Ohmori H.** (2001) "Resazurin as an electron acceptor in glucose oxidase-catalyzed oxidation of glucose." *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **49**(5): 622-5.

**Malhotra K., Kim S. T., Walsh C. und Sancar A.** (1992) "Roles of FAD and 8-hydroxy-5-deazaflavin chromophores in photoreactivation by *Anacystis nidulans* DNA photolyase." *J Biol Chem* **267**(22): 15406-11.

**Maréchal A. und Brisson N.** (2010) "Recombination and the maintenance of plant organelle genome stability." *New Phytol* **186**(2): 299-317.

**Marmur J. und Grossman L.** (1961) "Ultraviolet light induced linking of deoxyribonucleic acid strands and its reversal by photoreactivating enzyme." *Proc Natl Acad Sci U S A* **47**: 778-87.

**Maul M. J., Barends T. R., Glas A. F., Cryle M. J., Domratcheva T., Schneider S., Schlichting I. und Carell T.** (2008) "Crystal structure and mechanism of a DNA (6-4) photolyase." *Angew Chem Int Ed Engl* **47**(52): 10076-80.

**Mees A., Klar T., Gnau P., Hennecke U., Eker A. P., Carell T. und Essen L. O.** (2004) "Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair." *Science* **306**(5702): 1789-93.

**Meinke D. W., Cherry J. M., Dean C., Rounsley S. D. und Koornneef M.** (1998) "Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis." *Science* **282**(5389): 662, 679-82.

**Meyerowitz E. M.** (2001) "Prehistory and history of Arabidopsis research." *Plant Physiol* **125**(1): 15-9.

**Mitchell D. L., Jen J. und Cleaver J. E.** (1992) "Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation." *Nucleic Acids Res* **20**(2): 225-9.

**Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. und Van Breusegem F.** (2004) "Reactive oxygen gene network of plants." *Trends Plant Sci* **9**(10): 490-8.

**Moldt J., Pokorny R., Orth C., Linne U., Geisselbrecht Y., Marahiel M. A., Essen L. O. und Batschauer A.** (2009) "Photoreduction of the folate cofactor in members of the photolyase family." *J Biol Chem* **284**(32): 21670-83.

**Molina M. J. und Rowland F. S.** (1974) "Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalysed destruction of ozone." *Nature* **249**(5460): 810-812.

**Mone M. J., Volker M., Nikaido O., Mullenders L. H., van Zeeland A. A., Verschure P. J., Manders E. M. und van Driel R.** (2001) "Local UV-induced DNA damage in cell nuclei results in local transcription inhibition." *EMBO Rep* **2**(11): 1013-7.

**Müller F.** (1991) "Chemistry and biochemistry of flavoenzymes " 1. Aufl. CRC Press, (Boca Raton ).

**Murphy T. M. und Gao M. J.** (2001) "Multiple forms of formamidopyrimidine-DNA glycosylase produced by alternative splicing in Arabidopsis thaliana." *J Photochem Photobiol B* **61**(3): 87-93.

**Nakajima S., Sugiyama M., Iwai S., Hitomi K., Otsoshi E., Kim S. T., Jiang C. Z., Todo T., Britt A. B. und Yamamoto K.** (1998) "Cloning and characterization of a gene (UVR3) required for photorepair of 6-4 photoproducts in Arabidopsis thaliana." *Nucleic Acids Res* **26**(2): 638-44.

**Negrutiu I., Shillito R., Potrykus I., Biasini G. und Sala F.** (1987) "Hybrid Genes in the Analysis of Transformation Conditions .1. Setting up a Simple Method for Direct Gene-Transfer in Plant-Protoplasts." *Plant Molecular Biology* **8**(5): 363-373.

**Nielsen B. L., Cupp J. D. und Brammer J.** (2010) "Mechanisms for maintenance, replication, and repair of the chloroplast genome in plants." *J Exp Bot* **61**(10): 2535-7.

**Niki E.** (2009) "Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects." *Free Radic Biol Med* **47**(5): 469-84.

**Nishio T., Katoh A., Omote Y. und Kashima C.** (1978) "Photochemistry of 1-substituted-4,6-dimethyl-2(1H)-pyrimidin-2-ones: Synthesis of 2-oxo-1,3-diazabicyclo[2,2,0]hex-5-enes." *Tetrahedron Letters* **19**(18): 1543-1544.

**O'Brien E. A., Zhang Y., Wang E., Marie V., Badejoko W., Lang B. F. und Burger G.** (2009) "GOBASE: an organelle genome database." *Nucleic Acids Res* **37**(Database issue): D946-50.

**Oberpichler I., Pierik A. J., Wesslowski J., Pokorny R., Rosen R., Vugman M., Zhang F., Neubauer O., Ron E. Z., Batschauer A. und Lamparter T.** (2011) "A Photolyase-Like Protein from *Agrobacterium tumefaciens* with an Iron-Sulfur Cluster." *PLoS One* **6**(10): e26775.

**Okafuji A., Biskup T., Hitomi K., Getzoff E. D., Kaiser G., Batschauer A., Bacher A., Hidema J., Teranishi M., Yamamoto K., Schleicher E. und Weber S.** (2010) "Light-induced activation of class II cyclobutane pyrimidine dimer photolyases." *DNA Repair (Amst)* **9**(5): 495-505.

**Okamura T., Sancar A., Heelis P. F., Begley T. P., Hirata Y. und Mataga N.** (1991) "Picosecond laser photolysis studies on the photorepair of pyrimidine dimers by DNA photolyase. 1. Laser photolysis of photolyase-2-deoxyuridine dinucleotide photodimer complex." *Journal of the American Chemical Society* **113**(8): 3143-3145.

**Oldenburg D. J. und Bendich A. J.** (2004) "Changes in the structure of DNA molecules and the amount of DNA per plastid during chloroplast development in maize." *J Mol Biol* **344**(5): 1311-30.

**Osterlund M. T., Hardtke C. S., Wei N. und Deng X. W.** (2000) "Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*." *Nature* **405**(6785): 462-6.

**Öztürk N., Song S. H., Ozgur S., Selby C. P., Morrison L., Partch C., Zhong D. und Sancar A.** (2007) "Structure and function of animal cryptochromes." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **72**: 119-31.

**Öztürk N., Song S. H., Selby C. P. und Sancar A.** (2008) "Animal type 1 cryptochromes. Analysis of the redox state of the flavin cofactor by site-directed mutagenesis." *J Biol Chem* **283**(6): 3256-63.

**Palfey B. A. und Massey V.** (1998) "Flavin-dependent enzymes" *In: Comprehensive Biological Catalysis*. Ed.: Sinnott M. Academic Press (New York). Bd.III: 83–154.

**Park H., Zhang K., Ren Y., Nadji S., Sinha N., Taylor J. S. und Kang C.** (2002) "Crystal structure of a DNA decamer containing a cis-syn thymine dimer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(25): 15965-70.

**Park H. W., Kim S. T., Sancar A. und Deisenhofer J.** (1995) "Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*." *Science* **268**(5219): 1866-72.

**Pastwa E. und Blasiak J.** (2003) "Non-homologous DNA end joining." *Acta Biochim Pol* **50**(4): 891-908.

**Patrick M. H.** (1970) "Near-U.V. photolysis of pyrimidine heteroadducts in *E. coli* DNA." *Photochem Photobiol* **11**(6): 477-85.

**Payne G., Heelis P. F., Rohrs B. R. und Sancar A.** (1987) "The active form of *Escherichia coli* DNA photolyase contains a fully reduced flavin and not a flavin radical, both in vivo and in vitro." *Biochemistry* **26**(22): 7121-7.

**Payne G. und Sancar A.** (1990) "Absolute action spectrum of E-FADH<sub>2</sub> and E-FADH<sub>2</sub>-MTHF forms of *Escherichia coli* DNA photolyase." *Biochemistry* **29**(33): 7715-27.

**Payne G., Wills M., Walsh C. und Sancar A.** (1990) "Reconstitution of *Escherichia coli* photolyase with flavins and flavin analogues." *Biochemistry* **29**(24): 5706-11.

**Petersen J. L. und Small G. D.** (2001) "A gene required for the novel activation of a class II DNA photolyase in *Chlamydomonas*." *Nucleic Acids Res* **29**(21): 4472-81.

**Pokorny R., Klar T., Essen L. O. und Batschauer A.** (2005) "Crystallization and preliminary X-ray analysis of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*." *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **61**(Pt 10): 935-8.

**Pokorny R., Klar T., Hennecke U., Carell T., Batschauer A. und Essen L. O.** (2008) "Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(52): 21023-7.

**Polverelli M. und Teoule R.** (1974a) "Gamma irradiation of cytosine in an aerated aqueous solution. I. Identification of radiolysis products of cytosine resulting from the deamination pathway." *Z Naturforsch [C]* **29**(1): 12-5.

**Polverelli M. und Teoule R.** (1974b) "Gamma irradiation of cytosine in an aerated aqueous solution. II. Kinetic study of the formation of the radiolysis products of cytosine resulting from the deamination pathway." *Z Naturforsch [C]* **29**(1): 16-8.

**Popov N., Schmitt M., Schulzeck S. und Matthies H.** (1975) "Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates." *Acta Biol Med Ger* **34**(9): 1441-6.

**Povirk L. F. und Steighner R. J.** (1989) "Oxidized apurinic/apyrimidinic sites formed in DNA by oxidative mutagens." *Mutat Res* **214**(1): 13-22.

**Prasher D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W., Prendergast F. G. und Cormier M. J.** (1992) "Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein." *Gene* **111**(2): 229-33.

**Radany E. H. und Friedberg E. C.** (1980) "A pyrimidine dimer-DNA glycosylase activity associated with the *v* gene product of bacteriophage T4." *Nature* **286**(5769): 182-5.

**Reardon J. T., Nichols A. F., Keeney S., Smith C. A., Taylor J. S., Linn S. und Sancar A.** (1993) "Comparative analysis of binding of human damaged DNA-binding protein (XPE) and *Escherichia coli* damage recognition protein (UvrA) to the major ultraviolet photoproducts: T[c,s]T, T[t,s]T, T[6-4]T, and T[Dewar]T." *J Biol Chem* **268**(28): 21301-8.

**Reisbacher S.** (2009) "Funktionelle Analyse von Cryptochrom 3 aus *Arabidopsis thaliana*." Fachbereich Biologie Philipps-Universität Marburg, Marburg.

**Rhaese H. J. und Freese E.** (1968) "Chemical analysis of DNA alterations. I. Base liberation and backbone breakage of DNA and oligodeoxyadenylic acid induced by hydrogen peroxide and hydroxylamine." *Biochim Biophys Acta* **155**(2): 476-90.

**Rizzini L., Favory J. J., Cloix C., Faggionato D., O'Hara A., Kaiserli E., Baumeister R., Schafer E., Nagy F., Jenkins G. I. und Ulm R.** (2011) "Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein." *Science* **332**(6025): 103-6.

**Robberecht R., Caldwell M. M. und Billings W. D.** (1980) "Leaf Ultraviolet Optical Properties Along a Latitudinal Gradient in the Arctic-Alpine Life Zone." *Ecology* **61**(3): 612-619.



**Rodgers C. T. und Hore P. J.** (2009) "Chemical magnetoreception in birds: the radical pair mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(2): 353-60.

**Rousseaux M. C., Ballare C. L., Giordano C. V., Scopel A. L., Zima A. M., Szwarcberg-Bracchitta M., Searles P. S., Caldwell M. M. und Diaz S. B.** (1999) "Ozone depletion and UVB radiation: impact on plant DNA damage in southern South America." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26): 15310-5.

**Rowan B. A., Oldenburg D. J. und Bendich A. J.** (2010) "RecA maintains the integrity of chloroplast DNA molecules in Arabidopsis." *J Exp Bot* **61**(10): 2575-88.

**Rupert C. S.** (1960) "Photoreactivation of transforming DNA by an enzyme from bakers' yeast." *J Gen Physiol* **43**: 573-95.

**Rupert C. S., Goodgal S. H. und Herriott R. M.** (1958) "Photoreactivation in vitro of ultraviolet-inactivated Hemophilus influenzae transforming factor." *J Gen Physiol* **41**(3): 451-71.

**Ryoji M., Katayama H., Fusamae H., Matsuda A., Sakai F. und Utano H.** (1996) "Repair of DNA damage in a mitochondrial lysate of Xenopus laevis oocytes." *Nucleic Acids Res* **24**(20): 4057-62.

**Sakamoto A., Tanaka A., Watanabe H. und Tano S.** (1998) "Molecular cloning of Arabidopsis photolyase gene (PHR1) and characterization of its promoter region." *DNA Seq* **9**(5-6): 335-40.

**Sancar A.** (2003) "Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors." *Chem Rev* **103**(6): 2203-37.

**Sancar A., Lindsey-Boltz L. A., Unsal-Kacmaz K. und Linn S.** (2004) "Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints." *Annu Rev Biochem* **73**: 39-85.

**Sancar G. B., Jorns M. S., Payne G., Fluke D. J., Rupert C. S. und Sancar A.** (1987) "Action mechanism of Escherichia coli DNA photolyase. III. Photolysis of the enzyme-substrate complex and the absolute action spectrum." *J Biol Chem* **262**(1): 492-8.

**Schaffner W. und Weissmann C.** (1973) "A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution." *Anal Biochem* **56**(2): 502-14.

**Schägger H. und von Jagow G.** (1987) "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." *Anal Biochem* **166**(2): 368-79.

**Schall R. F., Jr., Fraser A. S., Hansen H. W., Kern C. W. und Tenoso H. J.** (1978) "A sensitive manual enzyme immunoassay for thyroxine." *Clin Chem* **24**(10): 1801-4.

**Schul W., Jans J., Rijksen Y. M., Klemann K. H., Eker A. P., de Wit J., Nikaido O., Nakajima S., Yasui A., Hoeijmakers J. H. und van der Horst G. T.** (2002) "Enhanced repair of cyclobutane pyrimidine dimers and improved UV resistance in photolyase transgenic mice." *EMBO J* **21**(17): 4719-29.

**Selby C. P. und Sancar A.** (2006) "A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(47): 17696-700.

**Setlow R. B.** (1966) "Cyclobutane-type pyrimidine dimers in polynucleotides." *Science* **153**(734): 379-86.

**Setlow R. B.** (1968) "The photochemistry, photobiology, and repair of polynucleotides." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **8**: 257-95.

**Shedge V., Arrieta-Montiel M., Christensen A. C. und Mackenzie S. A.** (2007) "Plant mitochondrial recombination surveillance requires unusual RecA and MutS homologs." *Plant Cell* **19**(4): 1251-64.

**Shibutani S., Takeshita M. und Grollman A. P.** (1991) "Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG." *Nature* **349**(6308): 431-4.

**Shigenaga M. K., Gimeno C. J. und Ames B. N.** (1989) "Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(24): 9697-701.

**Shimomura O., Johnson F. H. und Saiga Y.** (1962) "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea." *J Cell Comp Physiol* **59**: 223-39.

**Siemering K. R., Golbik R., Sever R. und Haseloff J.** (1996) "Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein." *Curr Biol* **6**(12): 1653-63.

**Southern E. M.** (1975) "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." *J Mol Biol* **98**(3): 503-17.

**Stadtman E. R.** (1993) "Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions." *Annu Rev Biochem* **62**: 797-821.

**Stapleton A. E., Thornber C. S. und Walbot V.** (1997) "UV-B component of sunlight causes measurable damage in field-grown maize (*Zea mays* L.): developmental and cellular heterogeneity of damage and repair." *Plant, Cell & Environment* **20**(3): 279-290.

**Stege H., Roza L., Vink A. A., Grewe M., Ruzicka T., Grether-Beck S. und Krutmann J.** (2000) "Enzyme plus light therapy to repair DNA damage in ultraviolet-B-irradiated human skin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(4): 1790-5.

**Subramanian C., Kim B. H., Lyssenko N. N., Xu X., Johnson C. H. und von Arnim A. G.** (2004) "The Arabidopsis repressor of light signaling, COP1, is regulated by nuclear exclusion: mutational analysis by bioluminescence resonance energy transfer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(17): 6798-802.

**Sun C. W., Griffen S. und Callis J.** (1997) "A model for the evolution of polyubiquitin genes from the study of Arabidopsis thaliana ecotypes." *Plant Mol Biol* **34**(5): 745-58.

**Sunderland P. A., West C. E., Waterworth W. M. und Bray C. M.** (2006) "An evolutionarily conserved translation initiation mechanism regulates nuclear or mitochondrial targeting of DNA ligase 1 in Arabidopsis thaliana." *Plant J* **47**(3): 356-67.

**Svoboda D. L., Smith C. A., Taylor J. S. und Sancar A.** (1993) "Effect of sequence, adduct type, and opposing lesions on the binding and repair of ultraviolet photodamage by DNA photolyase and (A)BC excinuclease." *J Biol Chem* **268**(14): 10694-700.

**Szymkowski D. E., Lawrence C. W. und Wood R. D.** (1993) "Repair by human cell extracts of single (6-4) and cyclobutane thymine-thymine photoproducts in DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(21): 9823-7.

**Takahashi M., Teranishi M., Ishida H., Kawasaki J., Takeuchi A., Yamaya T., Watanabe M., Makino A. und Hidema J.** (2011) "Cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase repairs ultraviolet-B-induced CPDs in rice chloroplast and mitochondrial DNA." *Plant J*.

**Tamada T., Kitadokoro K., Higuchi Y., Inaka K., Yasui A., de Ruiter P. E., Eker A. P. und Miki K.** (1997) "Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*." *Nat Struct Biol* **4**(11): 887-91.

**Tanaka A., Sakamoto A., Ishigaki Y., Nikaido O., Sun G., Hase Y., Shikazono N., Tano S. und Watanabe H.** (2002) "An ultraviolet-B-resistant mutant with enhanced DNA repair in *Arabidopsis*." *Plant Physiol* **129**(1): 64-71.

**Tarcha P. J., Chu V. P. und Whittern D.** (1987) "2,3-Diaminophenazine is the product from the horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of o-phenylenediamine." *Anal Biochem* **165**(1): 230-3.

**Teramura A. H.** (1983) "Effects of ultraviolet-B radiation on the growth and yield of crop plants." *Physiologia Plantarum* **58**(3): 415-427.

**Tevini M. und Iwanzik W.** (1983) "Inhibition of photosynthetic activity by UV-B radiation in radish seedlings." *Physiologia Plantarum* **58**(3): 395-400.

**The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*." *Nature* **408**(6814): 796-815.

**Thoma F.** (1999) "Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair." *EMBO J* **18**(23): 6585-98.

**Tommasi S., Swiderski P. M., Tu Y., Kaplan B. E. und Pfeifer G. P.** (1996) "Inhibition of transcription factor binding by ultraviolet-induced pyrimidine dimers." *Biochemistry* **35**(49): 15693-703.

**Ueda T., Kato A., Kuramitsu S., Terasawa H. und Shimada I.** (2005) "Identification and characterization of a second chromophore of DNA photolyase from *Thermus thermophilus* HB27." *J Biol Chem* **280**(43): 36237-43.

**Vairapandi M. und Duker N. J.** (1994) "Excision of ultraviolet-induced photoproducts of 5-methylcytosine from DNA." *Mutat Res* **315**(2): 85-94.

**Vande Berg B. J. und Sancar G. B.** (1998) "Evidence for dinucleotide flipping by DNA photolyase." *J Biol Chem* **273**(32): 20276-84.

**Varghese A. J.** (1970) "5-Thyminy-5,6-dihydrothymine from DNA irradiated with ultraviolet light." *Biochem Biophys Res Commun* **38**(3): 484-90.

**Varghese A. J. und Wang S. Y.** (1967) "Ultraviolet irradiation of DNA in vitro and in vivo produces a 3d thymine-derived product." *Science* **156**(3777): 955-7.

**Varghese A. J. und Wang S. Y.** (1968) "Thymine-thymine adduct as a photoproduct of thymine." *Science* **160**(824): 186-7.

**Veit M., Bilger T., Muhlbauer T., Brummet W. und Winter K.** (1996) "Diurnal changes in flavonoids." *J. Plant Physiol.* **148**: 478-82.

**Vichi P., Coin F., Renaud J. P., Vermeulen W., Hoeijmakers J. H., Moras D. und Egly J. M.** (1997) "Cisplatin- and UV-damaged DNA lure the basal transcription factor TFIID/TBP." *EMBO J* **16**(24): 7444-56.

**Wade H. K., Bibikova T. N., Valentine W. J. und Jenkins G. I.** (2001) "Interactions within a network of phytochrome, cryptochrome and UV-B phototransduction pathways regulate chalcone synthase gene expression in Arabidopsis leaf tissue." *Plant J* **25**(6): 675-85.

**Wang S. Y. und Varghese A. J.** (1967) "Cytosine-thymine addition product from DNA irradiated with ultraviolet light." *Biochem Biophys Res Commun* **29**(4): 543-9.

**Ward J. F.** (1985) "Biochemistry of DNA lesions." *Radiat Res Suppl* **8**: S103-11.

**Warner H. R., Demple B. F., Deutsch W. A., Kane C. M. und Linn S.** (1980) "Apurinic/apyrimidinic endonucleases in repair of pyrimidine dimers and other lesions in DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(8): 4602-6.

**Waters L. S., Minesinger B. K., Wiltout M. E., D'Souza S., Woodruff R. V. und Walker G. C.** (2009) "Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance." *Microbiol Mol Biol Rev* **73**(1): 134-54.

**Waterworth W. M., Jiang Q., West C. E., Nikaido M. und Bray C. M.** (2002) "Characterization of Arabidopsis photolyase enzymes and analysis of their role in protection from ultraviolet-B radiation." *J Exp Bot* **53**(371): 1005-15.

**Weber S.** (2005) "Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase." *Biochim Biophys Acta* **1707**(1): 1-23.

**Yamane T., Wyluda B. J. und Shulman R. G.** (1967) "Dihydrothymine from UV-irradiated DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**(2): 439-42.

**Yanagawa Y., Sullivan J. A., Komatsu S., Gusmaroli G., Suzuki G., Yin J., Ishibashi T., Saijo Y., Rubio V., Kimura S., Wang J. und Deng X. W.** (2004) "Arabidopsis COP10 forms a complex with DDB1 and DET1 in vivo and enhances the activity of ubiquitin conjugating enzymes." *Genes Dev* **18**(17): 2172-81.

**Yasui A., Yajima H., Kobayashi T., Eker A. P. und Oikawa A.** (1992) "Mitochondrial DNA repair by photolyase." *Mutat Res* **273**(2): 231-6.

**Yu X., Liu H., Klejnot J. und Lin C.** (2010) "The Cryptochrome Blue Light Receptors." *The Arabidopsis Book*: e0135.

**Zeugner A., Byrdin M., Bouly J. P., Bakrim N., Giovani B., Brettel K. und Ahmad M.** (2005) "Light-induced electron transfer in Arabidopsis cryptochrome-1 correlates with in vivo function." *J Biol Chem* **280**(20): 19437-40.

**Zharkov D. O.** (2008) "Base excision DNA repair." *Cell Mol Life Sci* **65**(10): 1544-65.

# Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Verbesserte *in vitro* und *in planta* DNA-Reparatur durch CPD-Photolyasen.“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_